



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

Producción de Etanol a Partir de la Macroalga *Ulva rigida*

MEMORIA PARA OPTAR AL TÍTULO DE INGENIERO CIVIL EN BIOTECNOLOGÍA

GONZALO ALFONSO BRIONES PARRA

PROFESOR GUÍA:

MARÍA ELENA LIENQUEO CONTRERAS

MIEMBROS DE LA COMISIÓN:

ORIANA SALAZAR AGUIRRE
BARBARA ANDREWS FARROW

SANTIAGO DE CHILE
MARZO 2012

Resumen

Hoy en día el tema de abastecimiento energético es cada vez más importante. En muchos países la matriz energética se basa en la explotación del recurso fósil, principalmente petróleo, el cual es un recurso limitado y que ha tenido una tendencia general al alza de precios. A lo anterior se añade las actuales normativas de emisiones que se están aplicando, las cuales prevén un futuro donde los combustibles fósiles se verán más limitados en su producción y aplicación. Los biocombustibles por tanto han sido una importante alternativa que se ha desarrollado por años, aunque, en un principio, muchos de los biocombustibles diseñados así competían (y compiten) en su materia prima con los recursos alimenticios (biocombustibles de primera generación). Además, una alternativa es el diseño de combustibles basado en residuos industriales, es decir materias primas que no son fuentes alimenticias (biocombustibles de segunda generación). Este estudio busca otra opción de producción de etanol, esta vez a partir de algas para producir biocombustibles de tercera generación, en especial se trabajó con la macroalga verde *Ulva rigida*.

Para alcanzar el objetivo planteado, fue necesario diseñar un procedimiento experimental, el cual consistió en un pretratamiento con ácido diluido (1% y 2% v/v de ácido sulfúrico) a diferentes temperaturas (30°C y 120°C). Después del pretratamiento es necesario neutralizar las muestras para detener dicha reacción. La fracción sólida resultante del pretratamiento es sometida a una hidrólisis enzimática, gracias a la acción de celulasas y celobiasas durante 72 horas (Celluclast® 1,5L - Cat C2730, y Novozyme® 188 - CatC6105). Luego se fermentaron los azúcares liberados en la sacarificación mediante dos estrategias diferentes: Sacarificación y Fermentación Simultáneas (SSF), y Sacarificación Y Fermentación Separadas (SHF).

Los resultados mostraron que el pretratamiento no es necesario; las muestras de algas utilizadas presentan azúcares fácilmente hidrolizables, y poseen una baja concentración de lignina, por lo que un pretratamiento con ácido diluido y temperatura no entrega mayor ventaja al proceso. Más aún, dicho procesamiento produce efectos negativos en la concentración de glucosa final. Por lo tanto, este proceso se suprimió del diseño planificado.

La sacarificación de las algas sin pretratamiento presentó un rendimiento del 27,2% respecto a la glucosa total de la muestra.

Por otra parte, los resultados de las dos estrategias de fermentación SSF y SHF fueron diferentes. El rendimiento, respecto a la conversión de glucosa total de la biomasa, de la estrategia SSF fue de un 50%, considerado alto para ser un primer acercamiento a la utilización de macroalgas. La estrategia SHF presentó un rendimiento del 24,5%. La diferencia de rendimientos indica que la estrategia SSF es mejor, aprovechándose de mejor forma los azúcares constituyentes de las macroalgas y obteniendo una mayor concentración de etanol en solución (5 g/l). Es importante mencionar que dicho rendimiento tiene su base en la composición total de glucosa de la macroalga, por lo que su alto valor puede corresponder a la fermentación de glucosa más la fermentación de otros azúcares no considerados en la composición total de glucosa. Aún así, la estrategia SSF es mejor que la SHF, ya que produce mayor etanol por gramo de biomasa empleado.

A partir de los resultados obtenidos, se concluye que se logró un primer acercamiento a la producción de etanol a partir de la macroalga *Ulva rigida*, diseñándose un proceso de operación y evaluando el pretratamiento de ácido diluido en dicho procedimiento. También se concluyó que la estrategia SSF es mejor que la estrategia SHF para la producción de etanol a partir de la mencionada macroalga. Finalmente, se recomienda complementar este estudio mediante la caracterización completa de la macroalga utilizada.

Agradecimientos

Al estar *ad-portas* de a terminar este largo y difícil camino, quiero agradecer de todo corazón a las personas que me han ayudado a llegar hasta acá.

A mi Padres, Manuel y Victoria, por estar siempre presente y apoyarme cuando las cosas no fueron fáciles. Su ayuda ha sido importantísima para poder sacar adelante esta tarea. Siempre que tuve dificultades sabía que podía contar con mi familia para superarlos. Si hubiese tenido que elegir a mis padres, no hubiese podido escoger mejor. Gracias por todos sus esfuerzos y sacrificios, los quiero mucho. A mi hermana Denisse, gracias por retarme e incitarme a trabajar. Gracias por tu apoyo y compañía, eres la mejor hermanita. Al Joaqui y al Nico, gracias por alegrar nuestra casa.

A mis amigos y compañeros de carrera: Camilo, gracias por tu desinteresada ayuda en el laboratorio, gracias por tus piques desde tu casa al CIBYB para abrir el portón y gracias por los buenos momentos que compartimos. Lore, muchas gracias por todo tu apoyo en el desarrollo de la memoria, siempre supe que ante cualquier duda podía contar contigo. Diego, gracias por el compañerismo que siempre tuviste conmigo -como cuando había que alternar los días de oficina con los días de laboratorio. Agradezco inmensamente que hayamos podido apoyarnos en los últimos de años, ya que de otra forma no sé si lo hubiese logrado. Has sido un verdadero partner y espero que sigamos así. A los tres, muchas gracias amigos.

A mis amigos y compañeros de facultad: Marito, siempre fue un gusto compartir almuerzos, bibliotecas, pajareras, changas, carretes, paseos y apuestas. Siempre voy a recordar los momentos que pasamos, tanto los sufridos como los agradables. Eres un amigo y persona espectacular y estoy muy contento de que seamos *societes*. No me queda más que decirte que Grande Marito. Rodrigo, gracias por todos los momentos que pasamos, me alegro mucho de que hayamos sido amigos por tanto tiempo. Si las changas nos unieron, espero que sigan manteniéndonos en contacto. Raúl, contigo somos amigos desde el primer día, lo cual es algo que no olvidaré. Eres un muy buen amigo y tenemos que seguir reuniéndonos más adelante si o si.

Agradezco a todos los profesores del departamento, en especial a la Profesora María Elena, por su enorme compromiso con el desarrollo de esta memoria, por su infinita disponibilidad en responder mis dudas y comentarios y por toda la ayuda brindada durante el año. Ha sido una excelente profesora guía. A la profesora Oriana, muchas gracias por la ayuda entregada no solo durante la memoria, sino que también durante todos los años de especialidad; su aporte ha sido muy importante para mí.

Finalmente, y no menos importante, Sele. Muchas gracias por tu compañía en los últimos años de universidad. Gracias por las galletitas que me dabas cuando recién nos conocíamos, gracias por ayudarme a descansar cuando lo necesitaba, gracias por tu paciencia y comprensión durante los momentos difíciles. Es fácil estar “en las buenas”, pero “en las malas” tu siempre estás. Sin duda has sido fundamental en este camino. Te quiero mucho.

Índice de Contenidos

CAPITULO I.....	1
Motivación, Marco Teórico, Antecedentes, Objetivos.	1
1. Motivación.....	1
1.1 Problemáticas medioambientales y energéticas	1
1.2 Bioetanol como combustible.	3
1.3 Macroalgas como materia prima de bioetanol.....	4
1.4 Situación del bioetanol en Chile.....	5
2. Marco teórico.....	6
2.1 Macroalgas	6
2.1.1. Antecedentes de las macroalgas.....	6
Algas Pardas	6
Algas rojas	7
Algas verdes.....	7
2.2 Pretratamiento de macroalgas	8
2.2.1 Pretratamiento con ácido diluido.	8
2.3 Sacarificación o hidrólisis enzimática.....	9
2.4 Fermentación	10
2.5 Estrategias de fermentación	10
2.5.1 Sacarificación y Fermentación Separadas (SHF)	10
2.5.2 Sacarificación y Fermentación Simultáneas (SSF).....	11
3. Antecedentes del trabajo.....	13
3.1 Algas como biocombustibles, energía renovable y desarrollo sustentable.	13
3.2 Patentes y artículos de investigación.....	13
3.3 Datos experimentales	19
4. Objetivos.....	20
4.1 Objetivo general.....	20
4.2 Objetivos específicos.....	20
CAPITULO II.....	21
Metodologías	21
5. Metodologías.....	21
5.1 Materiales.....	21
5.1.1 Materia prima.....	21
5.1.2 Enzimas.....	21
5.1.3 Microorganismo fermentador	21
5.2 Procedimientos	21

5.2.1 Obtención de macroalgas	21
5.2.2 Secado y obtención de la humedad del alga.....	22
5.2.3 Determinación de actividad de celulasas.....	22
5.2.4 Determinación de la actividad de celobiasas.....	22
5.2.5 Pretratamiento mediante hidrólisis acida.....	23
5.2.6 Hidrólisis enzimática o sacarificación.....	23
5.2.7 Fermentación SHF	23
5.2.8 Fermentación SSF	24
5.2.9 Medición de glucosa.....	24
5.2.10 Medición de etanol	24
CAPITULO III.....	25
Resultados, Discusión.....	25
6. Resultados y discusión	25
6.1 Estudios exploratorios sobre condiciones de pretratamiento y sacarificación	25
6.2 Resultados del pretratamiento	26
6.3 Resultados de sacarificación post pretratamiento.	28
6.4 Resultados de sacarificación sin pretratamiento.....	31
6.5 Resultados de estrategia SHF y SSF.....	33
6.6 Comparación de resultados con los antecedentes	35
CAPITULO IV	36
Conclusiones, Recomendaciones	36
7. Conclusiones.....	36
8. Recomendaciones	37
9. Referencias.....	38
10. Anexos	43
Anexo A: Mapa de Sudamérica mostrando el estado de la normativa respecto a biocombustibles.	43
Anexo B: Macroalga verde <i>Ulva rigida</i>	44
Anexo C: Curva de calibración de etanol v/s Área de integración. Resultados de la cromatografía gaseosa.	45
Anexo D: Montajes experimentales.....	46
Anexo E: Memoria de cálculo de los rendimientos	49
E.1 Sacarificación muestras sin pretratamiento.	49
E.2 Rendimiento fermentación SSF y SHF	49

ÍNDICE DE IMÁGENES

Imagen 1. Materias primas que proveen combustible en el mundo.	1
Imagen 2. Estructura del ácido A ₃₅ y del ácido B ₃₅ .	8
Imagen 3. Esquema de la estrategia SHF.	11
Imagen 4. Esquema de la estrategia SSF.	12
Imagen 5. Ejemplo de resultados obtenidos en la solicitud de patente “METHOD OF PRODUCING BIOFUEL USING SEA ALGAE”.	15
Imagen 6. Ejemplo de resultados obtenidos en documento “Two-stage Hydrolysis of Invasive Algal Feedstock for Ethanol Fermentation”.	16
Imagen 7. Ejemplo de resultados obtenidos en documento “Production of high concentrations of bioethanol from seaweeds that contain easily hydrolyzable polysaccharides”.	18
Imagen 8. Diagrama de flujo de las etapas que comprende la producción de etanol a partir de algas	22
Imagen A-1. Estado de la normativa respecto a biocombustibles en los países de Sudamérica.	43
Imagen B-1. Macroalga a utilizar.	44
Imagen C-1. Curva de calibración de concentración de etanol v/s área de integración.	45
Imagen D-1. Montaje pretratamiento con ácido diluido.	46
Imagen D-2. Muestras del pretratamiento.	46
Imagen D-3. Montaje de la neutralización post hidrólisis ácida.	47
Imagen D-4. Rotores de centrifugación.	47
Imagen D-5. Matraces Erlenmeyer-modificados.	48

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Cinética de sacarificación de <i>U. rigida</i> con distintas cargas enzimáticas.	25
Figura 2. Concentración de azúcar en muestras post pretratamiento con ácido sulfúrico.	26
Figura 3. Cinética de sacarificación de <i>U. rigida</i> post pretratamiento.	28
Figura 4. Cinética de sacarificación de <i>U. rigida</i> con y sin pretratamiento.	31
Figura 5. Producción de etanol en experimentos de SSF y SHF en <i>U. rigida</i> .	33

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Producción de etanol según el país durante el año 2008.	4
Tabla 2: Comparación entre hidrólisis ácido diluido e hidrólisis enzimática.	9
Tabla 3. Rendimiento del pretratamiento para las distintas condiciones de operación.	27
Tabla 4. Cantidad de glucosa liberada y rendimiento posterior al pretratamiento y sacarificación por unidad de sustrato.	30
Tabla 5. Rendimiento de la sacarificación de las muestras sin pretratamiento.	32
Tabla 6. Rendimiento de las estrategias SSF y SHF.	34
Tabla E-1. Concentración y masa de etanol para estrategia SSF y SHF.	50

Nomenclatura y abreviaciones

- ERNC: Energías Renovables No Convencionales
- FPU: Unidades de Papel Filtro
- SFH: Separate Enzymatic Hydrolysis and Fermentation
- SSF: Simultaneous Saccharification and Fermentation

Motivación, Marco Teórico, Antecedentes, Objetivos.

1. Motivación

En el presente capítulo se describe cual fue la motivación por la que se desarrolla este estudio, es decir, la producción de etanol a partir de macroalgas. Para esto se tiene en consideración la situación energética y los problemas medioambientales que hay en el país y en el mundo, el uso de bioetanol como combustible y como posible sustituyente de combustibles fósiles. Además, se hace una breve descripción de las macroalgas como materia prima para la producción de biocombustibles. Finalmente, se muestra la situación en que está Chile respecto a los biocombustibles, específicamente respecto al bioetanol.

1.1 Problemáticas medioambientales y energéticas

En los tiempos venideros, la demanda de energía aumentará a niveles cada vez mayores a medida que crezcan las economías y poblaciones. Esto ejercerá presión sobre el sistema de suministro y requerirá que se ponga mayor énfasis en el uso eficiente de energía, así como también en la búsqueda de nuevas fuentes. En la actualidad el mundo emplea una gran variedad de fuentes de energía. Hoy en día el petróleo y el gas natural proveen cerca del 60% de la energía primaria del mundo [1], como se observa en la imagen 1.

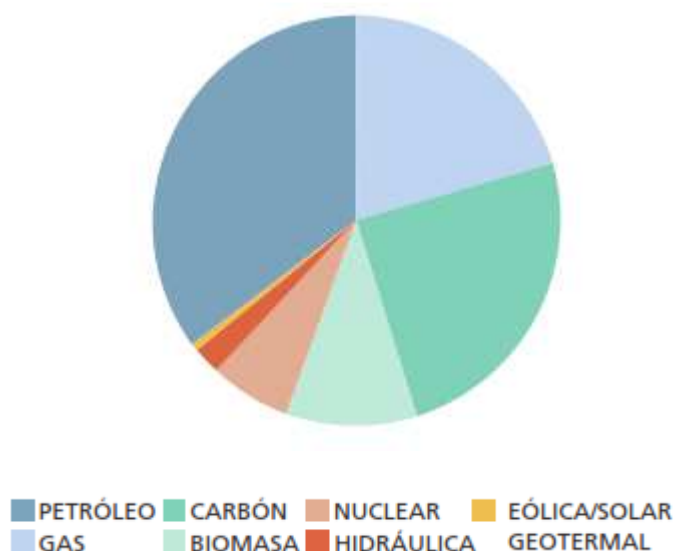


Imagen 1. Materias primas que proveen combustible en el mundo [1].

Su explotación presenta algunos conflictos que deben solucionarse, tales como un posible agotamiento de dicho recurso (incierto) o los problemas de contaminación que provoca, generando un aumento de los gases de invernadero en la atmósfera [2]. Para esto es que será necesario expandir todas las fuentes de energía para cubrir la demanda en forma

confiable. En esta oportunidad, se estudia la posibilidad de desarrollar fuentes de energía renovables no convencionales (ERNC), específicamente, energía a partir de biomasa [3].

En Chile, la política energética nacional pretende conciliar tres objetivos: seguridad de suministro, eficiencia económica de dicho suministro y sustentabilidad ambiental en el desarrollo del sector. Es por esto que se ha estimulado el desarrollo de las ERNC, ya que presentan los siguientes beneficios [3]:

- Fuentes autóctonas que contribuyen a la diversificación y a disminuir la vulnerabilidad externa.
- Costos de generación estables. Independientes de costos de derivados del petróleo. Contribuyen a disminuir la incertidumbre del precio a largo plazo de la energía.
- Suministro confiable en escalas temporales largas: poca variabilidad interanual (eólica, biomasa, geotermia), a excepción de la pequeña hidráulica.
- Menores plazos de maduración y construcción (eólica, biomasa, pequeña hidráulica), a excepción de la geotermia.
- Proyectos pequeños o modulares y distribuidos geográficamente, lo que brinda flexibilidad para adaptarse al crecimiento de la demanda sistémica y local.
- En términos generales, las ERNC son de menor impacto ambiental (local y global).
- Pueden contribuir a valorizar zonas degradadas o de bajo valor. Por ejemplo, proyectos eólicos en zonas de secano costero.
- Pueden contribuir a diversificar los giros de negocios de diferentes actividades industriales y agropecuarias (uso de residuos de biomasa).
- Oportunidades para el desarrollo tecnológico o de industria de servicios propios (geotermia, biomasa, biogás).

La posibilidad de producir combustibles a partir de biomasa se ha convertido en un asunto cada vez más importante teniendo en consideración la crisis medioambiental que se observa a nivel mundial por los efectos del calentamiento global y la carencia de fuentes fósiles de combustible. En función de esto es que los biocombustibles se presentan como una alternativa para resolver este problema, dado que pueden ser producidos a partir de un recurso renovable como lo es la biomasa, presentando la ventaja adicional de permitir la reducción de la emisión neta de CO₂, ya que parte del gas liberado por combustión es fijado por la biomasa al crecer [4]. Estas razones han permitido que el mercado de los biocombustibles de origen renovable se abra paso, de manera de poder desplazar y establecerse como una alternativa real a los combustibles de origen fósil. Ejemplos de esto se observan en Brasil y Estados Unidos con la producción de bioetanol, y por otro lado en Alemania, Austria y Francia con el caso de biodiesel [5].

Muchos estudios han estado realizando estudios de producción de etanol a partir de material lignocelulósico. En ese sentido diferentes materias primas se han estudiado para su producción [6]:

- Almidón de cereales (trigo, maíz, cebada, yuca)
- Azúcares (caña de azúcar, remolacha azucarera, sorgo dulce)
- Sustancias celulósicas (desechos agrícolas y forestales)

En donde las principales fuentes actuales de producción de bioetanol a nivel mundial son: maíz yuca, remolacha, sorgo dulce y caña de azúcar [6].

Los biocombustibles como el bioetanol, biodiesel y biogás pueden ser clasificados en combustibles de 1ª, 2ª y 3ª generación de acuerdo al tipo de materia prima a partir de la cual son producidos. Los biocombustibles de 1ª generación hacen referencia a aquellos que son generados directamente a partir de cultivos vegetales que se cosechan de manera de obtener su contenido de azúcar, almidón o aceite, los que posteriormente son convertidos en combustibles líquidos por medio del uso de herramientas tecnológicas convencionales. Por su parte, el concepto de biocombustibles de 2ª generación hace referencia a aquellos que son producidos a partir de residuos lignocelulósicos provenientes del tratamiento de bosques y de residuos de la industria agrícola, tales como cortezas, copas, ramas de árboles, entre otros tipos de residuos, lo que son mucho más abundantes y pueden ser utilizados sin interferir en los mercados alimenticios, ni resultar en un excesivo desgaste de la tierra ni otros recursos naturales [7]. Finalmente, los combustibles de 3ª generación son los producidos a partir de micro o macroalgas, ya que no compiten con otros organismos fotosintéticos por el suelo, sino que se pueden crecer en el mar o lagos [8]. A partir de esta materia prima se puede producir etanol (fermentación de macroalgas) o diesel (transesterificación de ésteres de microalgas) [9].

En base a lo anterior es que en el presente trabajo se enfoca en la producción de etanol a partir de macroalgas verdes, más específicamente la especie *Ulva rigida*, de las cuales no se tiene reporte.

1.2 Bioetanol como combustible.

Bioetanol, es el producto que identifica al etanol o alcohol etílico. Este compuesto, como biocombustible, puede ser usado solo o bien como una mezcla con gasolina en diferentes proporciones. El empleo del bioetanol puro debe realizarse en motores específicamente diseñados para ello. Sin embargo, el uso de mezclas en proporciones bajas no requeriría de cambios en los vehículos, siempre y cuando el bioetanol debe ser deshidratado (anhidro) a fin de eliminar los efectos indeseables sobre la mezcla, producidos por el agua (separación de fases gasolina– etanol/agua)[10]. Actualmente es ampliamente producido en países como Brasil y Estados Unidos, donde la producción de bioetanol alcanzó el año 2009, niveles de producción de 6578 MM y 10600 MM galones de etanol respectivamente. Otros países también han comenzado a producir este recurso en las cantidades que se muestran en la tabla 1.

Tabla 1. Producción de etanol según el país durante el año 2008 [11].

País	MM de Galones
Usa	10600
Brasil	6578
Unión Europea	1039,5
China	541,55
Tailandia	435,2
Canadá	290,59
Colombia	83,21
India	91,67
Australia	56,8
Otros	247,3
Total	19535

Dentro de las principales ventajas que acompañan el uso de bioetanol como combustible se encuentra la reducción de las emisiones de gases invernadero y las necesidades de petróleo en comparación con la gasolina. De acuerdo a análisis realizados por la EPA, el uso de etanol reduce en un 61% las emisiones de gas invernadero en comparación con la gasolina [12]. Adicionalmente, estudios de la Universidad de Berkeley – California estiman que por cada galón de petróleo usado en el ciclo de producción etanol, se producen cerca de 20 galones de etanol [12]. Esto es debido a que la producción etanol está relacionada a un ciclo de carbono concurrente, mientras que el petróleo y otros combustibles fósiles son el resultado de un ciclo de carbón no activo. Por estas razones se habla de que el etanol posee un ciclo neto neutro de carbono o al menos puede llegar a serlo una vez que las tecnologías sean desarrolladas [12].

1.3 Macroalgas como materia prima de bioetanol.

Las macroalgas son una especie de algas marinas que están compuestas de polisacáridos (algunas contienen hasta un 70% [13]), que son la plataforma para la producción de varios químicos vía fermentación. De esta forma, la producción de etanol es la técnica más efectiva para el aprovechamiento de la fracción de carbohidratos presentes en las macroalgas [9]. Una característica muy importante de las macroalgas es que no liberan compuestos nitrogenados o sulfurados al ambiente, lo que le da otra ventaja con respecto a otras formas de producción de energía como si lo hace el petróleo y sus derivados.

Otra de las ventajas de trabajar con macroalgas en Chile es que este país cuenta con un vasto territorio costero para el cultivo de este tipo de algas, lo que ayuda de gran manera en el avance de estudios relacionados con esto. Su fácil cultivo y cosecha genera bajos costos, que también son puntos importantes en el desarrollo de un proyecto [14]. Por otro lado, no necesitan agua fresca para su crecimiento, que es un tema muy importante en estos tiempos en que el elemento vital comienza a escasear. Además, no posee el problema de la discusión de combustibles de primera o segunda generación, ya que no compite por comida o combustible, y el hecho de cultivar macroalgas, no aumenta el precio de los alimentos [15].

Además, las algas se proponen como la biomasa más promisoriosa y que puede ser fácilmente transformada a etanol ya que estas poseen baja [16] o nula [17] cantidad de lignina, razón

por la cual la celulosa y/o hemicelulosa no debiese presentar resistencia a la hidrólisis, y por lo tanto, se acelera el pretratamiento de este material celulósico.

Para producir etanol a partir de algas, se debe seguir un proceso determinado. Existen estudios presentados en el congreso “33rd Symposium on Biotechnology for Fuels and Chemicals” de Seattle [18] y patentes de Pereira [19] y Ronnie y Kevin [20] que desarrollan este tema, a partir de cuales se adapta el protocolo a las condiciones en las que se trabajará en este estudio. La descripción del proceso es desarrollada con más detalle en el cuerpo del informe, indicando en extenso los pasos a seguir en cada etapa.

1.4 Situación del bioetanol en Chile

Las perspectivas que se tienen en Chile para el uso del bioetanol como combustible están relacionadas primordialmente con el uso de los residuos forestales y agrícolas del país. Dada la superficie limitada con que cuenta el país no es posible dedicar zonas exclusivamente al desarrollo de cultivos con fines energéticos. En el año 2006 se constituyó una mesa de trabajo integrada por el actual Ministerio de Energía, Ministerio de Agricultura, la Comisión Nacional de Medio Ambiente y la Superintendencia de Electricidad y Combustibles, para crear una política pública sobre biocombustibles líquidos como el etanol, junto con un marco regulatorio para promover su desarrollo [21]. Desde el año 2008 se ha estado impulsando una política nacional de biocombustibles como complemento a la política nacional de energía. Una de las medidas que ha tomado el gobierno para fomentar la utilización de biocombustibles en vehículos es la exención del impuesto específico que pagan las gasolinas y el diesel. Además, ha prestado apoyo a diversas investigaciones en biocombustibles de centros, universidades y empresas privadas, junto con el desarrollo de un catastro nacional de materias primas y convenios de entidades públicas y privadas con países que son referentes internacionales en el tema [22]. El gobierno tiene como objetivo poder desarrollar la industria de los biocombustibles de modo que al corto y mediano plazo se pueda sustituir inicialmente el 5% de gasolina y diesel, por bioetanol y biodiesel respectivamente, y de esta forma reducir la dependencia externa de combustibles fósiles (72% de la energía en Chile se importa [24]), junto con generar una sustentabilidad ambiental y lograr la dinamización de la agroindustria. En Chile se han impulsado dos consorcios orientados a la investigación y desarrollo de biocombustibles lignocelulósicos (BIOCOMSA y BIOENERCEL S.A.), y 3 orientados a micro y macroalgas (Algafuels, BAL FUELS y Desert Bioenergy) [55]

A pesar de estos intentos por promover el desarrollo de esta fuente de energía, Chile está muy rezagado respecto de la mayoría de los países de Sudamérica, e incluso de nuestros vecinos, los cuales ya cuentan con una normativa de promoción que permita asignar recursos al impulso de esta industria y a la Investigación y Desarrollo e Innovación. Los países que se encuentran en una situación similar a la de Chile en cuanto a la normativa de biocombustibles son Ecuador, Surinam, Guyana Francesa y Venezuela [24] (ver anexo A).

2. Marco teórico

A continuación se muestran los principales factores que influyen en la producción de etanol: las macroalgas a utilizar, los pretratamientos y las condiciones aplicadas, la sacarificación y las estrategias de fermentación, ya sean simultáneas o separadas.

2.1 Macroalgas

2.1.1. Antecedentes de las macroalgas

Como las plantas, muchas especies de macroalgas tienen una pared celular rígida basada en celulosa y además acumulan almidón como su principal compuesto de almacenamiento intracelular. Como se mencionó anteriormente, algunas algas marinas comprenden hasta un 70% de polisacáridos, entre los cuales están los carbohidratos de la pared celular, polisacáridos intracelulares y polisacáridos de almacenamiento [13]. Ambos tipos de azúcares intracelulares y de pared pueden ser convertidos en azúcares fermentables.

Aunque la glucosa, galactosa y manosa (hexosas), las cuales están presentes en muchos polisacáridos, tienen una fórmula idéntica, sus átomos constituyentes tienen una disposición espacial diferente, lo que junto con la forma en la que se unen permite la elaboración de un gran número de polisacáridos con diferentes formas y en consecuencia diferentes propiedades. Lo mismo ocurre con las pentosas (xilosas y arabinosas) y las deoxyhexosas (ramnosa y fucosa). La gran cantidad de diferentes polisacáridos que se han encontrado en las algas marinas son solo una pequeña porción de las posibles estructuras que se pueden generar. La evolución ha hecho que dichas estructuras le otorguen una ventaja adaptativa en el ambiente donde son encontradas. Algunas estructuras sirven como reserva de nutrientes, y otras como componentes estructurales de la pared celular, pero muchas tienen otras funciones que aun no han sido bien comprendidas [25].

Existen 3 tipos de macroalgas: pardas, rojas y verdes, las cuales se describen brevemente a continuación:

Algas Pardas [26]: son casi exclusivamente marinas, ya que sólo se conocen unas pocas especies de agua dulce. Son muy abundantes en costas rocosas donde crecen en la zona litoral y sublitoral, especialmente en aguas frías agitadas y bien aireadas. Estas algas son importantes productores primarios, donde llegan a formar verdaderos bosques submarinos, los cuales constituyen un ambiente favorable para numerosos animales marinos. La combinación de pigmentos fotosintéticos les permite realizar la fotosíntesis a muy diferentes niveles en el océano, incluso a profundidades donde solo llegan las longitudes de onda más cortas (azul-verdosa) de la luz solar. Su pared celular contiene, además de celulosa, ácido algínico y sales sulfatadas. Estos compuestos dan resistencia y flexibilidad al alga, ya que forman geles en la matriz intercelular, ayudándoles a resistir las tensiones provocadas por las olas y las corrientes marinas. Además, intervienen en el intercambio iónico y ayudan a evitar la desecación del alga, especialmente cuando viven en la zona litoral, donde queda periódicamente expuesta al aire y a la luz solar.

Estos mismos compuestos son los que hacen que las algas pardas sean de gran utilidad e interés económico. En algunas especies los alginatos pueden constituir hasta el 20-40% del peso seco del alga. Estos compuestos son químicamente complejos, por lo que no es rentable su síntesis química, y por lo tanto, se siguen extrayendo de algas recolectadas en la naturaleza. Son compuestos gelificantes, por lo que son utilizados como aglutinantes, espesantes y estabilizantes en helados, mermeladas, salsas, mayonesas y productos lácteos [26].

Algas rojas: Las algas rojas son principalmente marinas con muy poca representación en el agua dulce y de dimensiones macroscópicas existiendo pocos casos de especies unicelulares. Los pigmentos de estas algas pueden variar según las condiciones en las que viven pudiendo variar de color si estas condiciones cambian. Al igual que las algas pardas, pueden vivir en las profundidades marinas ya que posee los pigmentos rojos y de color azul violáceo, capaces de absorber la energía luminosa de las radiaciones verdes y azules y conseguir la fijación del carbono mediante la fotosíntesis. Estas algas aparte de ocupar el carbono para su uso en el proceso de la fotosíntesis, al igual que la mayoría de los vegetales, tienen un mecanismo adicional de la absorción de carbono de calcificación. El calcio es depositado en las paredes de las células de algas coralinas en forma de carbonato de calcio de la misma manera que los corales suelen hacer. A pesar de que contribuyen considerablemente a la mayor parte de carbonato de calcio que forma la estructura de los arrecifes de coral, su papel más importante en la mayoría de las zonas del arrecife, es actuar como cemento, lo que obliga a los materiales que forman los arrecifes generar una estructura sólida y robusta [27].

Algas verdes: Son algas muy diversas en cuanto a su morfología y organización general y tienen gran plasticidad en su desarrollo y metabolismo, lo que las ha llevado a colonizar numerosos hábitats. Los pigmentos fotosintéticos que posee son los a y b, β -caroteno y otros carotenoides. Almacenan almidón dentro del cloroplasto. Su pared celular está compuesta principalmente por celulosa, y en algunos casos presenta además otros polímeros o está calcificada. Estas algas viven en ambientes marinos costeros formando parte de la nanoplancton o sujetas al fondo marino. También es posible encontrarlas abundantemente en aguas dulces, lagos y ríos. Además pueden desarrollarse en ambientes terrestres, tales como rocas, lodos o troncos de árboles [28].

Las macroalgas verdes están compuestas de muchos polisacáridos, entre ellos está un polisacárido llamado *ulvan*. *Ulvan* está principalmente compuesto de secuencias de repeticiones de disacáridos compuestos de ramnosa sulfatada y ácido glucurónico, ácido idurónico o xilosa [29]. La mayor repetición de disacáridos son los ácidos aldobiurónicos designados como tipo A, ácido 3-sulfato ulvanobiurónico (A_{3S}) y como tipo B, ácido 3-sulfato ulvanobiurónico (B_{3S}) (ver imagen 2).

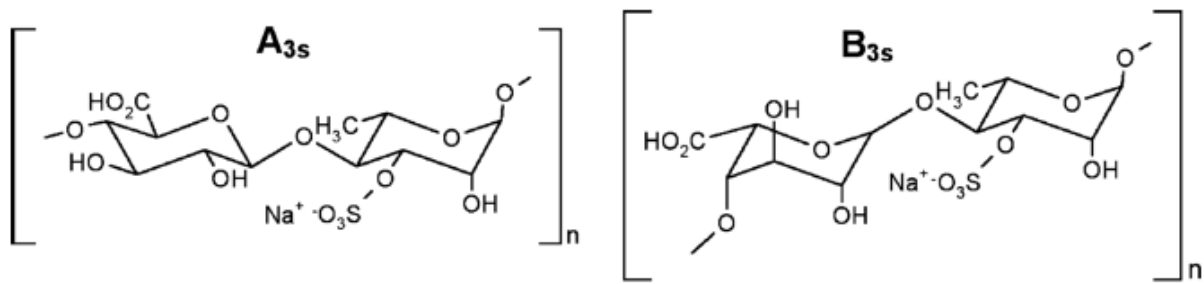


Imagen 2. Estructura del ácido 3-sulfato ulvanobiurónico (A_{3s}) y del ácido 3-sulfato ulvanobiurónico (B_{3s})

En general, se observa que las macroalgas poseen una estructura basada en polisacáridos, lo que sugiere que es posible aprovechar los componentes de su pared celular para fermentarlos y producir etanol. Sin embargo, es necesario exponer dichos azúcares para facilitar la fermentación, para lo cual necesita, en algunos casos, pretratamiento y una hidrólisis enzimática de los polisacáridos.

El trabajo de la presente memoria se enfocara en la producción de etanol a partir de este último tipo de algas, es decir, la macroalga verde *Ulva rigida* (ver anexo B)

2.2 Pretratamiento de macroalgas

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

El objetivo principal del pretratamiento es disminuir el grado de cristalinidad de la malla de polisacáridos que conforma la pared celular y de esta forma hacerlos más susceptibles para la sacarificación. Existen muchos tipos de pretratamiento para biomasa lignocelulósica tales como los físicos (molienda), físico-químicos (explosión de vapor, agua líquida caliente y explosión de fibra de amoníaco), químicos (hidrólisis Ácida, alcalinidad, agentes oxidantes, oxidación húmeda, ozonólisis, Líquido Iónico) y biológicos (uso de Hongos) [30]. Algunos de estos han sido aplicados en macroalgas (ver Capítulo I, sección 3).

2.2.1 Pretratamiento con ácido diluido.

El pretratamiento más usado es el de hidrólisis ácida, que consiste en tratar la biomasa con ácido sulfúrico diluido a una concentración y una temperatura determinada. Este método permite en desorganizar la estructura cristalina que posee las macro y microfibras de una pared celular y de esta forma liberar los polímeros de celulosa y/o modificar los poros del material de tal forma que permita a las enzimas penetrar dentro de las fibras y hacerlas susceptibles a la hidrólisis enzimática [31]. Este tipo de pretratamientos se aplica a todo tipo de biomasa que posee una capa de lignina que se encarga de recubrir la estructura cristalina de celulosa y hemicelulosa [31]. A pesar de que este método se usa ampliamente en otro tipo de biomasa distinto a las algas, será utilizado en este estudio ya que existen antecedentes que así lo aconsejan (ver Capítulo I, sección 3).

En general, los pretratamientos clásicos implican el uso de soluciones de ácido sulfúrico diluido, usualmente al 5 % con rendimientos del 100 % a 160 °C, o concentrado, al 77 % a más baja temperatura [32]. Durante el uso de este tipo de pretratamientos, además de la hidrólisis ocurren algunas reacciones de condensación y eliminación, en donde las azúcares de la hemicelulosa generan furfurales y derivados de furfural en presencia de ácido en caliente, que son sustancias tóxicas para las levaduras [33] o incluso pueden provocar la inhibición de las enzimas que llevan a cabo la sacarificación, por lo que es importante verificar las condiciones óptimas de pretratamiento para que se pueda asegurar un rendimiento aceptable en la generación de etanol a partir de un cada tipo de algas, ya que como se mencionó antes, cada especie varía morfológica y estructuralmente según el ambiente en que se encuentre.

2.3 Sacarificación o hidrólisis enzimática

Este proceso consiste en la liberación de los azúcares constituyentes de los polímeros que componen la biomasa. Se lleva a cabo mediante la acción de enzimas, las cuales son un complejo enzimas altamente específico formado por endoglucanasas y exoglucanasas y β -glucosidasas [31], las cuales operan bajo condiciones suaves (pH 4,0 – 4,5 y temperatura 40-50°C). Por lo tanto se espera bajos problemas de corrosión y baja toxicidad en los hidrolizados como ventajas de este proceso [31].

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

Los principales factores que afectan la hidrólisis enzimática son la concentración y calidad de sustrato, los pretratamientos aplicados, actividad de la celulasa (que también depende de su origen), condiciones de hidrólisis, tales como la temperatura, pH y agitación, etc. La temperatura y pH óptimos de las diferentes celulasas están generalmente en el rango de 40 - 50°C y pH entre 4 y 5 respectivamente [31]. Sin embargo, el tiempo de residencia y pH se afectan mutuamente, por lo que es importante conocer cuáles son las condiciones óptimas para las diferentes enzimas y tipos de biomasa.

Dependiendo de las características de las algas, estas pueden ser preparadas para la fermentación de distintas formas, ya sea solo pretratándolas, solo hidrolizándolas con enzimas, o una mezcla de ambas. A continuación se muestra una comparación general entre ambos procesos.

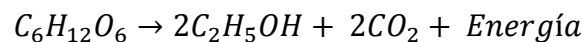
Tabla 2: Comparación entre hidrólisis con ácido diluido e hidrólisis enzimática [31].

Variable comparativa	Hidrólisis con ácido diluido	Hidrólisis enzimática
Condiciones de hidrólisis leves	No	Si
Altos rendimientos de hidrólisis	No	Si
Inhibición por producto durante la hidrólisis	No	Si
Formación de co-productos inhibitorios	Si	No
Bajos costos de catálisis	Si	No
Corto tiempo de hidrólisis	Si	No

2.4 Fermentación

La fermentación es un proceso catabólico de oxidación incompleta realizada principalmente por algunos microorganismos con el fin de producir energía a partir de un compuesto carbonado, es decir, corresponde a la conversión de un carbohidrato, por ejemplo azúcar, en un ácido (cuando se realiza a través de una bacteria) o un alcohol (cuando se realiza a través de una levadura).

En particular, la fermentación alcohólica corresponde al proceso realizado principalmente en levaduras, las cuales convierten o transforman la glucosa en etanol y CO₂, tal como se muestra en la siguiente ecuación:



Para poder obtener un buen rendimiento en la fermentación es necesario analizar algunos parámetros de la levadura, tales como tasa de fermentación, tolerancia al etanol, tolerancia a la temperatura, temperatura óptima de operación, pH óptimo de operación, tolerancia al dióxido de sulfuro, posible inhibición por producto, etc., para que de esta forma se prepare un proceso con condiciones que puedan favorecer la producción de etanol [35].

Una cepa ampliamente utilizada es la cepa comercial de *Saccharomyces cerevisiae* RED STAR®, la cual resiste concentraciones superiores a 12 [g/l] de etanol [36] y su temperatura óptima de operación es 37-40°C [30] [37].

Existen diferentes estrategias de sacarificación y fermentación, dentro de las que se encuentran las siguientes [31]:

1. Sacarificación y Fermentación Separadas (SHF).
2. Sacarificación y Fermentación Simultáneas (SSF).
3. Sacarificación y Co-Fermentación Simultáneas (SSCF).
4. Sacarificación y Fermentación Simultáneas No Isotérmicas (NSSF).
5. Bioprocesos Consolidados (CBP).

A continuación se describen las dos estrategias utilizadas en el presente estudio.

2.5 Estrategias de fermentación

2.5.1 Sacarificación y Fermentación Separadas (SHF)

En esta estrategia, denominada SHF (Separate Enzymatic Hydrolysis and Fermentation), la sacarificación de la biomasa y la fermentación ocurren en unidades separadas, es decir, primero se realiza la sacarificación y posteriormente el producto de dicha sacarificación es fermentado en otra operación (ver imagen 3). La principal ventaja de este método es que se puede realizar tanto la hidrólisis enzimática como la fermentación en sus condiciones óptimas de operación.

La inhibición de la actividad celulasa por los azúcares liberados, principalmente celobiosa y glucosa, es el principal inconveniente de este método. A bajas concentraciones de celobiosa,

como por ejemplo 6 [g/l], la actividad celulasa se reduce hasta en un 60% [31]. En presencia de glucosa la actividad también decrece, sin embargo esta no se ve tan afectada como en presencia de celobiosa. Por otro lado, la glucosa es un fuerte inhibidor de la β -glucosidasa. A niveles de 3 [g/l] de glucosa, la actividad de β -glucosidasa se reduce en un 75% [31].

Otro posible problema de esta técnica es la contaminación con microorganismos que estén en el ambiente, razón por la cual se debe trabajar con las máximas precauciones de esterilidad. La sacarificación es un proceso de larga duración (3 ó 4 días), y una solución de azúcar diluida siempre tiene riesgo de contaminación microbiana, incluso a altas temperaturas (40 o 50°C). Una posible fuente de contaminación podría ser las enzimas, ya que es difícil autoclavarlas debido a su posible desactivación [31].

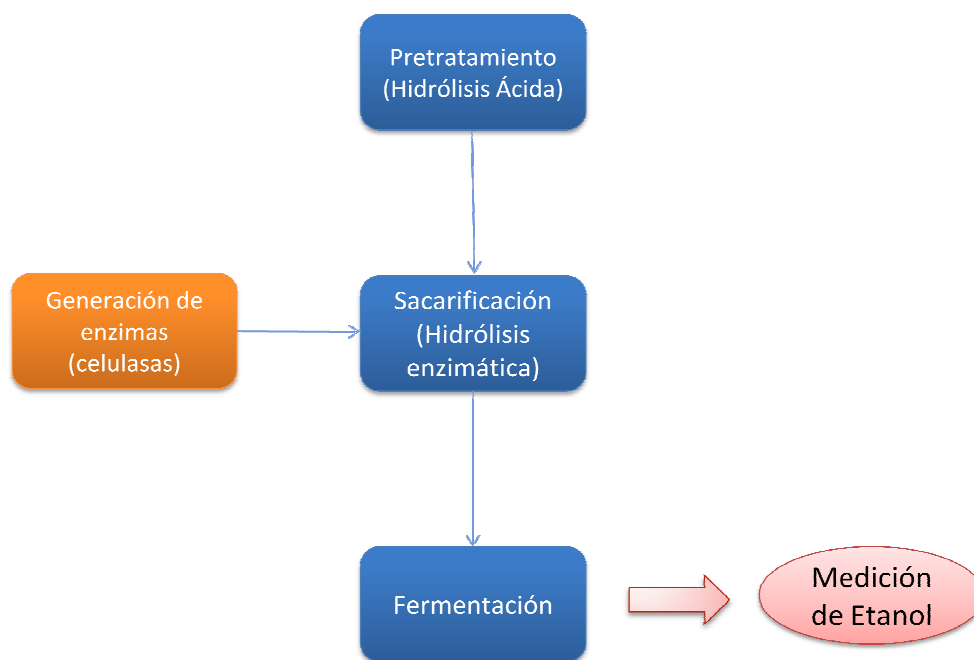


Imagen 3. Esquema de la estrategia SHF.

2.5.2 Sacarificación y Fermentación Simultáneas (SSF)

En esta estrategia, denominada SSF (Simultaneous Saccharification and Fermentation), la sacarificación de la biomasa y la fermentación ocurren en un solo paso (en una sola operación) (ver imagen 4). En este método, la glucosa producida por las enzimas es consumida inmediatamente por el microorganismo fermentador presente (levadura). Esta es una gran ventaja comparada con la estrategia SHF, ya que se minimizan los efectos de la inhibición por glucosa y celobiosa al estar presente en bajas concentraciones en el medio. En general, esta estrategia genera mayor concentración de etanol y requiere menor cantidad de enzima [38 - 41]. El riesgo de contaminación es menor que en el caso de la estrategia SHF, ya que la presencia de etanol reduce la posibilidad de contaminación [42].

La desventaja que presenta esta técnica radica en que no se pueden optimizarse ambas condiciones de operación como si se hace en el caso SHF, sino que debe trabajarse en el óptimo común, por lo que es importante mantener la temperatura y pH lo más cercanas a las óptimas. La temperatura óptima de sacarificación se encuentra cercana a los 50°C, mientras que *S. cerevisiae* tiene una temperatura óptima cercana a los 37°C, razón por la

cual el compromiso entre ambas condiciones para hidrólisis enzimática y fermentación es cercano a los 40°C [31].

En esta ocasión, la sacarificación es la etapa limitante de esta estrategia, por lo que se están desarrollando estudios buscando un microorganismo que sea termoestable y tenga la capacidad de fermentar a temperaturas más cercanas a la de hidrólisis [43 - 47].



Imagen 4. Esquema de la estrategia SSF.

3. Antecedentes del trabajo

En esta sección se muestran los antecedentes bibliográficos que están dirigidos a macroalgas. Se describe patentes relacionadas y artículos científicos que estudian las condiciones de operación, junto con los resultados obtenidos en dichos estudios.

3.1 Algas como biocombustibles, energía renovable y desarrollo sustentable.

Históricamente las algas han sido usadas para diferentes propósitos, dentro de los cuales se puede encontrar la obtención de omega 3, ácidos grasos, fuentes de energía, fertilizantes, plásticos, proteínas recombinantes y pigmentos [48].

Este paradigma de multiproductos de las algas la convierte a esta materia prima en un perfecto candidato materia prima para el concepto de biorefinería [48]. La biorefinería es capaz de integrar los procesos de conversión de biomasa y la producción de combustible, potencia y químicos con valor agregado a partir de ella [49]. Es por esta razón que el uso de alga como biomasa para generar energía es considerado como un elemento muy importante dentro de los acercamientos para desarrollar un Parque Integrado de Energías Renovables (IREP), y que permita un desarrollo sustentable [50].

Además, hay estudios que indican que el sector de biocombustibles a partir de algas puede integrarse con la industria lignocelulósica [51]. Por ejemplo, las cepas de algas *Chlamydomonas* y *Dunaliella* genéticamente modificadas para estabilizar la expresión de celulasas/hemicelulasas, pueden ser utilizadas para integrar dicha producción de enzimas como un co-producto del sector de biocombustibles a partir de algas. Las enzimas pueden ser entregadas a la hidrólisis enzimática de la biomasa celulósica. Si este procesamiento se realiza a grandes escalas, el costo de producción sería muy bajo [51]. Este es un ejemplo en donde las algas y los lignocelulósicos pueden contribuir sinérgicamente en la viabilidad comercial.

Por esta razón es que los esfuerzos se han enfocado en definir un procesamiento o metodología de las algas con el fin de obtener productos de ellas con valor comercial. El producto estudiado en este ensayo corresponde a etanol, por lo que los siguientes antecedentes analizados se refieren al mismo.

3.2 Patentes y artículos de investigación

Los principales procesos existentes para la producción de etanol a partir de algas han sido presentados como solicitudes de patentes por algunas empresas. Los desarrolladores de estos procesos son en su mayoría estadounidenses, brasileños y orientales (koreanos, chinos, japoneses). El objetivo de presentar dichas solicitudes es que en caso de ser concedida, esta pueda ser usada y explotada impidiendo que terceros la utilicen sin el consentimiento de su creador. Poseer el derecho de patente convierte un producto o procedimiento en activos comerciales con un valor de mercado adecuado a su utilidad e importancia [52].

Las principales solicitudes de patentes son las siguientes:

- “PROCESS FOR THE PRODUCTION OF ETHANOL FROM ALGAE” [19]. Sus autores son Bush Ronnie A. [US] y Hall Kevin M [US]. En solicitud, las especies utilizadas son *Spirogyra*, *Cladophora* y *Oedogonium*, las cuales corresponden a diferentes tipos de algas verdes. Esta solicitud de patente declara que la fermentación puede ser mediada por dos tipos de levadura, las cuales son *Saccharomyces cerevisiae* y *Saccharomyces uvarum*.

El proceso de producción de etanol divulgado por la memoria descriptiva de la presente solicitud de patente consiste en un aumento de la concentración de almidón, formación de filamentos, formación de colonias de algas. Luego se realiza la cosecha de las algas para formar biomasa. Se inicia el decaimiento de biomasa (hidrólisis). Posteriormente se contacta la biomasa decaída con levadura capaz de fermentarla y formar una solución de fermentación. Finalmente se separa el etanol resultante de la solución de fermentación.

Esta solicitud de patente es muy importante, ya que entrega las etapas principales que deben desarrollarse para lograr el objetivo: hidrólisis de biomasa y fermentación de los azúcares, indicando además el microorganismo que utiliza (*Saccharomyces cerevisiae*). Se observa una etapa final de separación de etanol de la solución, pero en esta memoria no se realizará debido a que se encuentra fuera de los alcances.

- “PRODUCTION OF ETHANOL FROM ALGAE” [20]. Sus autores son Nei Pereira Junior y colaboradores. Esta solicitud de patente se refiere a los procesos de producción de etanol a partir de la fermentación de los azúcares hidrolizados obtenidos de las algas. Las principales etapas descritas por esta solicitud son: obtención y limpieza de las algas. Luego se realiza una fragmentación y secado de ellas. Luego se hidrolizan los azúcares que poseen las algas. Estos azúcares son fermentados con el uso de levaduras que tengan dicha capacidad, para finalmente obtener el etanol mediante una destilación. Las especies de algas utilizadas en este proceso corresponden preferentemente a algas rojas y son las siguientes: *Gelidium*, *Gigardina*, *Gracilaria*, *Encheuma*, *Pterocladia*, *Kappaphycus* y *Hypnea*. Además, se describen menciona una gran cantidad de posibilidades para el organismo fermentador, dentro de las que se puede encontrar las siguientes especies de levadura: *Candida*, *Clavispora*, *Debaryomyces*, *Geotrichum*, *Kloeckera*, *Kluyveromyces*, *Metschnikowia*, *Pachysolen*, *Pichia*, *Kazachstania*, *Rhodotorula*, *Saccharomyces*, *Torulaspota* y *Zygosaccharomyces*.

La presente solicitud provee con antecedentes respecto a la hidrólisis de biomasa, especificando que además se puede realizar a través de enzimas (celulasas), adicionando información relevante y útil para el diseño del proceso de producción de etanol a partir de la macroalga *Ulva rigida* en el presente estudio. Con respecto a los otros puntos, es bastante similar a la anterior, solo que utiliza especies de algas diferentes y además muestra rangos de operación de las condiciones de hidrólisis y fermentación, tales como temperatura.

- “METHOD OF PRODUCING BIOFUEL USING SEA ALGAE” [53]. Corresponde a una tercera solicitud de patentes, cuyos inventores son Gyung Soo KIM y colaboradores. La presente solicitud se refiere a un método para producir biocombustibles, más específicamente a un método para producir biocombustibles comprendiendo los pasos de generación de azúcares a partir de algas marinas, o a partir de polisacáridos extraídos de algas marinas mediante el tratamiento de dichos azúcares con una hidrólisis enzimática y/o una catálisis hidrolítica. Posteriormente se produce la fermentación de los azúcares utilizando un microorganismo que pueda producir biocombustible. Esta solicitud resuelve el problema de la falta de materias prima, ya que usa algas como biomasa y reduce los costos de producción al excluir los procesos de eliminación de lignina requeridos en otros tipos de procesamiento clásicos de madera, entregando ventajas económicas y medioambientales.

La solicitud anteriormente presentada es muy importante ya que plantea la posibilidad de omitir el pretratamiento con ácido. Al no presentar lignina, la estructura de la pared de las algas no es tan resistente como la de la biomasa, por lo que dicho pretratamiento puede ser obviado. Ambas condiciones serán estudiadas en esta memoria.

Además, este documento entrega algunos resultados cuantitativos respecto a la producción de etanol a partir de algas. Uno de los resultados obtenidos se muestra solo a modo de ejemplo en la imagen 5.

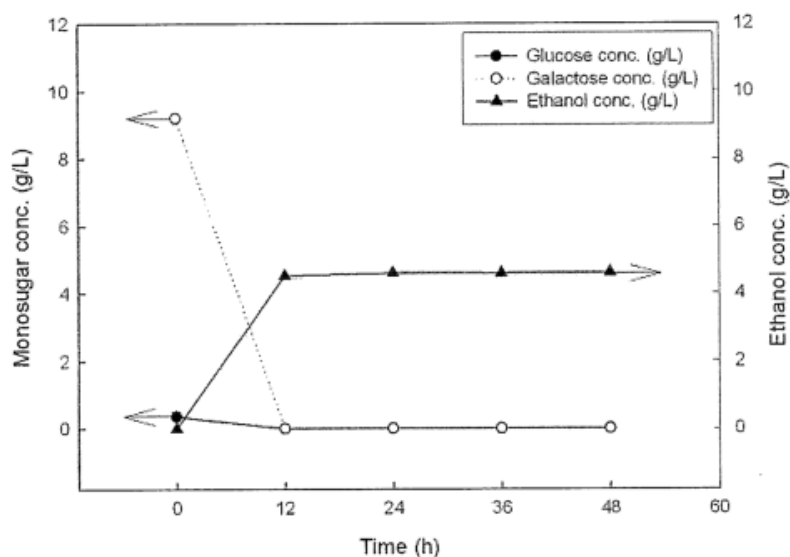


Imagen 5. Ejemplo de resultados obtenidos en la solicitud de patente “METHOD OF PRODUCING BIOFUEL USING SEA ALGAE”. El microorganismo utilizado corresponde a Brettanomyces custersii [53].

A partir de los 3 documentos previamente analizados, es posible desarrollar y diseñar un proceso de producción de etanol a partir de algas. Los tres procesos comprenden etapas

unitarias similares, por lo que se pueden adaptar al presente trabajo. Las condiciones de operación no están completamente definidas en las solicitudes de patentes, por lo que se recurre a otro tipo de antecedentes, los que se discuten a continuación:

- “Two-stage Hydrolysis of Invasive Algal Feedstock for Ethanol Fermentation” [13]. Este documento tiene como objetivo desarrollar un método de sacarificación de las algas para la producción de bioetanol de tercera generación, utilizando como materia prima la macroalga marina *Gracilaria salicornia*. Los autores indican que este estudio es el primer reporte con resultados precisos respecto a la generación de biocombustibles de tercera generación a partir de macroalgas, sugiriendo que existe un gran potencial en la producción de energías renovables usando dicho tipo de biomasa.

Tal como lo indica su título, el estudio corresponde a una hidrólisis en dos etapas, las que corresponden a una combinación de la hidrólisis con ácido diluido y una hidrólisis enzimática. A partir de este estudio se obtuvo como resultado que las condiciones óptimas de operación para un pretratamiento con ácido diluido son 120°C y 2% de ácido sulfúrico durante 30 minutos. Este pretratamiento genera bajo rendimiento respecto a la concentración de glucosa en el hidrolizado (4,3 g glucosa/Kg de biomasa), sin embargo los resultados de la hidrólisis en dos etapas produjeron un aumento hasta 13,8 g de glucosa por kilogramo de biomasa fresca. Finalmente, la fermentación *batch* produjo 79,1 g de etanol por un kilogramo de alga en masa seca empleando la cepa *Escherichia coli* KO11, la cual es productora de etanol.

Un ejemplo gráfico de los resultados obtenidos en el presente trabajo se muestra en la imagen 6:

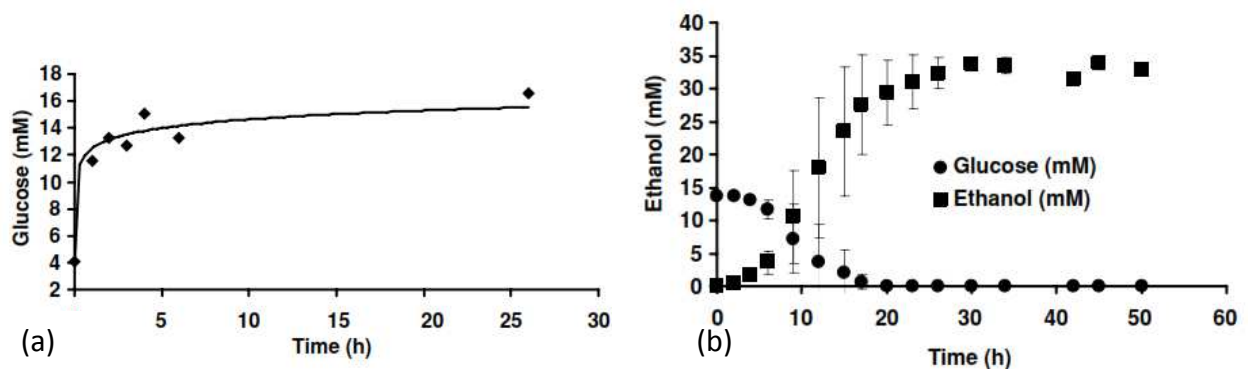


Imagen 6. Ejemplo de resultados obtenidos en documento “Two-stage Hydrolysis of Invasive Algal Feedstock for Ethanol Fermentation”. (a) Concentración de glucosa en el tiempo de operación de hidrólisis con ácido diluido. (b) Concentración de etanol y glucosa durante el tiempo de operación de la fermentación [13].

La imagen 6 (a) muestra la concentración de glucosa obtenida durante la hidrólisis con ácido diluido en condiciones óptimas, es decir, 120°C y 2% de ácido sulfúrico. A partir de las 4 horas de incubación, dicha concentración no aumentó significativamente. La máxima concentración obtenida fue 16,6 mM, lo que corresponde a 3 [g/l] de glucosa.

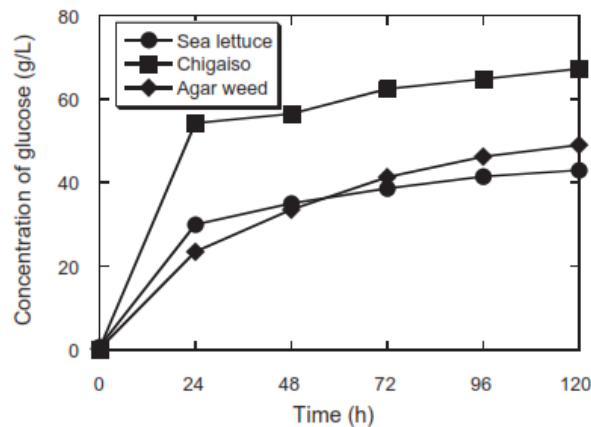
La imagen 6 (b) muestra como aumenta la concentración de etanol a medida que se va consumiendo la glucosa presente. A las 18 horas de operación, la glucosa presente ya ha sido completamente consumida, a este tiempo la concentración de etanol es 28 mM, equivalente a 1,3 [g/l] de etanol. Sin embargo, la concentración de etanol continúa aumentando hasta 34 mM (equivalente a 1,56 [g/l] de etanol) a medida que se extiende la incubación. Este incremento continuo de la concentración de etanol claramente indica que otros azúcares que no son glucosa están presentes en la solución y son fermentadas por *E.coli* KO11. *E.coli* KO11 tiene la capacidad de fermentar azúcares de 5 y 6 carbonos, por lo tanto, la cinética de producción de etanol indica que esta alga contiene diferentes tipos de azúcares, incluyendo azúcares de 5 carbonos.

Los documentos mostrados anteriormente son los antecedentes más cercanos al presente estudio; no obstante, recientemente se publicó información relevante a la materia de la memoria en curso, la cual revela que es posible producir etanol a partir de algas que contienen polisacáridos fácilmente hidrolizables.

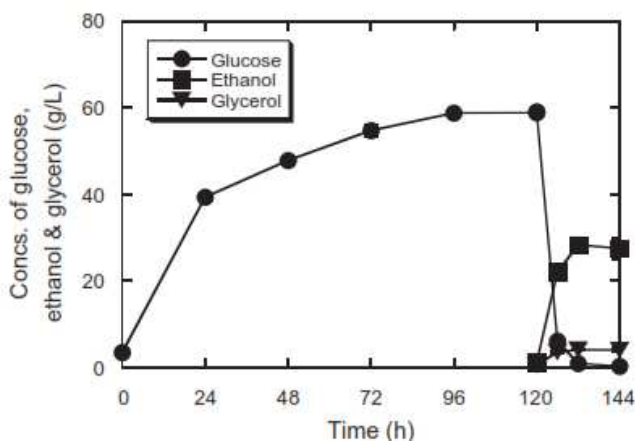
- “Production of high concentrations of bioethanol from seaweeds that contain easily hydrolyzable polysaccharides” [54]. Para la producción de etanol, este estudio utiliza 3 tipos de algas: *sea lettuce*, *chigaiso* y *agar weed*, las cuales son representativas de los 3 tipos de macroalgas, es decir verdes, pardas y rojas respectivamente. En primer lugar, las algas utilizadas contienen muy baja concentración de lignina, por lo que no es necesario un pretratamiento de ellas, razón por la cual se dice que son fácilmente hidrolizables. Para obtener altas concentraciones de bioetanol, se aplican dos métodos de sacarificación. Primero se usan sacarificaciones sucesivas, el cual corresponde a un método donde el hidrolizado de la primera sacarificación, después de remover el residuo, es sucesivamente utilizado como el líquido hidrolizante de una segunda sacarificación. El segundo método aplicado en el estudio fue una sacarificación combinada, en la cual a la hidrólisis ácida de ciertos polisacáridos le sigue una hidrólisis enzimática de otros polisacáridos para producir una alta concentración de azúcares fermentables. El microorganismo utilizado para la fermentación es *S. cerevisiae* IAM 4178, y sus condiciones de cultivo están indicadas en la metodología del mismo documento.

A continuación se muestra en la imagen 7 algunos de los resultados obtenidos respecto a la macroalga verde.

(a)



(b)



(c)

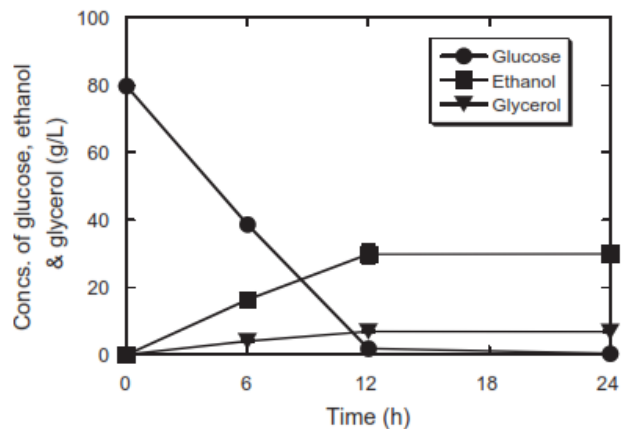


Imagen 7. Ejemplo de resultados obtenidos en documento "Production of high concentrations of bioethanol from seaweeds that contain easily hydrolyzable polysaccharides". (a) Concentración de glucosa en el tiempo de operación de la hidrólisis enzimática simple. (b) Concentración de etanol y glucosa durante el tiempo de operación de la hidrólisis enzimática combinada. (c) Concentración de etanol y glucosa durante el tiempo de operación de las hidrólisis enzimáticas sucesivas [54].

Los resultados presentados en la imagen 7 (a) muestra la concentración de glucosa que se obtiene durante la sacarificación simple. El alga verde *sea lettuce* alcanza concentraciones de 43 [g/l]. Esta alta concentración de conversión de la sacarificación de algas sin un pretratamiento puede ser debido a la baja concentración de lignina que poseen.

La imagen 7 (b) muestra la concentración de glucosa y etanol obtenidos durante una hidrólisis enzimática combinada. Se obtuvo una concentración de glucosa de 59,1 [g/l], y de 27,5 [g/l] de etanol. La imagen 7 (c) muestra los resultados del otro método de sacarificación, donde se obtiene una máxima concentración de glucosa de 78,8 [g/l] de glucosa y de 30 [g/l] de etanol.

A partir de los resultados de la imagen 7 (b) y (c), es posible concluir que el método de sacarificaciones sucesivas tiene mejor rendimiento que el método de sacarificaciones combinadas, a partir del cual se obtiene un aumento efectivo de la concentración de glucosa y etanol.

3.3 Datos experimentales

Un ensayo realizado por R. González (2012 - Comunicación personal), indica la composición total de glucosa que presenta la macroalga a utilizar en el presente estudio (*Ulva rigida*). Este ensayo consiste en una hidrólisis ácida fuerte con ácido sulfúrico 70%, la cual provoca un fuerte estrés de la pared, liberando azúcares y desarmando su estructura. Los resultados obtenidos indican que las muestras poseen $0,368 \frac{g \text{ glucosa}}{g \text{ biomasa}}$.

A partir de estos antecedentes, se diseña la metodología y los procedimientos que se realizarán experimentalmente para obtener bioetanol a partir de la macroalga verde *Ulva rigida*. Dichos elementos se profundizan más adelante en el Capítulo II, sección 5 – Metodologías.

4. Objetivos

4.1 Objetivo general

- Estudiar las condiciones necesarias para producir etanol a partir de la macroalga *Ulva rigida*.

4.2 Objetivos específicos

- Estudiar procesos de pretratamiento de macroalgas, analizando dos condiciones de temperatura (30°C y 120°C) y de concentración de ácido sulfúrico (0% y 2%).
- Estudiar los niveles de conversión en la fermentación de las macroalgas con *Saccharomyces cerevisiae* (Red Star), utilizando las estrategias SHF y SSF.

5. Metodologías

5.1 Materiales

5.1.1 Materia prima

La macroalga utilizada en los diferentes experimentos corresponde a *Ulva rigida* C. Agardh (división: chlorophyta; familia: ulvaceae; genero: ulva; especie: rigida), que es una alga verde recolectada en el submareal de Bahía Herradura de Guayacán, Coquimbo. Esta alga ha sido donada por el Centro de Investigación y Desarrollo Tecnológico en Algas (CIDTA), de la Universidad Católica del Norte, sede Coquimbo. Dicha muestra de alga fue entregada tamizada y con un tamaño adecuado para el pretratamiento (polvo muy fino). El CIDTA ha determinado que los hidratos de carbono más comunes en este género de algas son: ramnosa, fucosa, arabinosa, 3,6-anhydro-galactosa, xilosa, manosa (componente principal en macroalgas), 6-O-Me-galactosa, galactosa y glucosa.

5.1.2 Enzimas

Las enzimas empleadas se adquirieron al Laboratorio SIGMA - ALDRICH®, las celulasas provienen del hongo *Trichoderma reesei* (ATCC 26921) y su nombre comercial es Celluclast® 1,5L (Cat C2730), mientras que la celobiasa provienen del hongo *Aspergillus niger* y su nombre comercial es Novozyme® 188 (CatC6105).

5.1.3 Microorganismo fermentador

Para el estudio de las distintas fermentaciones se utilizó la levadura *Saccharomyces cerevisiae*, cepa Ethanol Red® (RED STAR), donada por la empresa S.I. LESAFFRE FERMENTIS.

5.2 Procedimientos

Para comprender de mejor forma la metodología del proceso se muestra un diagrama de flujo de las etapas que comprende el estudio de producción de etanol a partir de algas (ver imagen 8).

5.2.1 Obtención de macroalgas

La macroalga a utilizar (*Ulva rigida*) fue proporcionada por el CIDTA, de la Universidad Católica del Norte, sede Coquimbo. El tamaño de la muestra recibida es el apropiado para comenzar el pretratamiento.

5.2.2 Secado y obtención de la humedad del alga

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

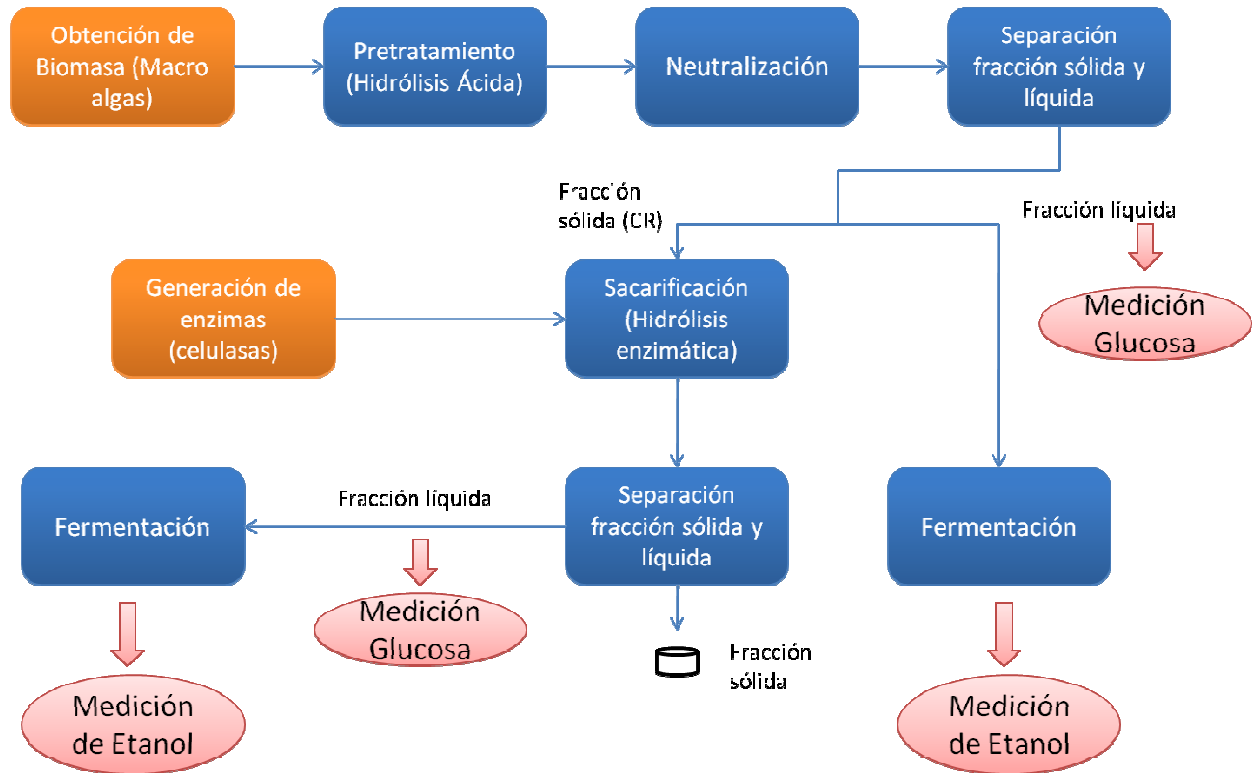


Imagen 8. Diagrama de flujo de las etapas que comprende la producción de etanol a partir de algas. Los bloques naranjos representan etapas que no son realizadas en el presente trabajo. Los bloques azules corresponden a las etapas efectivamente ejecutadas en el estudio. Los globos rosados corresponden a etapas de medición y control.

5.2.3 Determinación de actividad de celulasas

La actividad para las celulasas Celluclast® 1,5L empleada en el presente estudio fue de 87 FPU/ml. El procedimiento para medir dicho valor corresponde al método clásico utilizado en previos estudios [30], [37].

5.2.4 Determinación de la actividad de celobiasas

La actividad para las celobiasas Novozyme® 188 empleada en el presente estudio fue de 650 CBU/ml. El procedimiento para medir dicho valor corresponde al método clásico utilizado en previos estudios [30], [37].

5.2.5 Pretratamiento mediante hidrólisis ácida

En tubos Falcon de 50 ml se agregan, a una razón 1:10 (en p/v, 1 g y 10 ml), el material a pretratar y el ácido sulfúrico a una concentración de 0% y 2% v/v. El proceso de pretratamiento con ácido diluido se prueba a dos temperaturas diferentes: 30°C y 120°C. La primera condición de temperatura se efectúa en un baño termostático, mientras que para alcanzar los 120°C los tubos se disponen en un autoclave con un volumen de 1,5 l de agua destilada; los tubos se cierran y el conjunto es llevado a una campana extractora de gases; se cierra el autoclave y se somete al contacto directo de una llama mediante un mechero. En el momento en que el agua ha empezado a hervir, se deja reaccionar por 30 minutos. Para terminar la reacción, se enfría el autoclave mediante un baño de hielo y se extraen las muestras que finalmente también son depositadas en hielo.

Cuando las muestras alcanzan la temperatura ambiente se vierten en un vaso precipitado de 250 ml y se procede a neutralizarlas mediante hidróxido de sodio 2M hasta alcanzar un pH entre 8 y 11. Se toma una muestra de 30 µl para la posterior medición de glucosa, que se almacena a 4°C. La mezcla se centrifuga a 10000 rpm (12860x g) durante 10 minutos y se separa la fracción sólida de la líquida. La fracción sólida será posteriormente sacarificada y se guarda la fracción líquida.

5.2.6 Hidrólisis enzimática o sacarificación

A partir de la fracción sólida post pretratamiento, se prepara la sacarificación del material utilizando una carga de sustrato del 5% razón p/v (0,2 g de material, 4 ml de reacción) en un tubo Falcon de 15 ml. El medio en el cual se realiza la reacción está constituido por una mezcla tampón-enzimas. Las enzimas corresponden a una mezcla de celulasa/celobiosa a una razón 7,5:1 (volumen). La cantidad de celulasas se calcula según la carga enzimática definida (20 unidades de papel filtro –FPU- por gramo de material) y por la actividad establecida (FPU/ml en la solución comercial). Definido los volúmenes de enzimas se completan los 4 ml del volumen de trabajo con tampón acetato de sodio (50 mM; pH 4,8) y se deja incubando en un agitador rotatorio a 250 rpm por 72 horas a 50°C. Se toman muestras de 30 µl a las 0, 3, 6, 24, 48 y 72 horas, para la posterior determinación de glucosa. Terminada la reacción la suspensión es centrifugada y separada, donde la fracción sólida se descarta y la fracción líquida se almacena a 4°C. Todos los experimentos fueron realizados en duplicado y se reportan los valores promedios.

5.2.7 Fermentación SHF

La fermentación se llevó a cabo en condiciones anaeróbicas y no estériles. Las fracciones líquidas de la etapa anterior no son autoclavadas ya que las altas temperaturas de dicho proceso pueden provocar una cristalización de los azúcares de la fracción líquida. Los materiales utilizados si fueron autoclavados (matraces Erlenmeyer-modificados de 50 ml, tapas de goma, llaves de paso y buffer). De la fracción líquida proveniente de la sacarificación, 18 ml se agregan al matraz de 50 ml, se agrega 2 ml de buffer acetato de sodio 10x (el cual posee los siguientes nutrientes para proporcionar un medio base: 5 g/l de extracto de levadura, 0,025 g/l de $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ y 0,5 g/l de $(NH_4)_2HPO_4$). A la mezcla anterior se agregan 0,2 g de levadura seca para obtener una concentración inicial de 10 g/l de células. Las fermentaciones se llevan a cabo en condiciones anaeróbicas en un agitador rotatorio a 300 rpm y 40°C durante 72 horas. Con una jeringa estéril se toman muestras de 300 µl a las 0, 3, 6, 24, 48 y 72 horas. El volumen de muestra se centrifuga en tubos eppendorf de 1,5 ml a 10000 rpm (10620x g) durante 20 minutos a 20°C. 200 µl del sobrenadante se almacenan a

4°C para posterior medición de etanol. Todos los experimentos fueron realizados en duplicado y se reportan los valores promedios.

5.2.8 Fermentación SSF

Esta estrategia de fermentación se realizó utilizando las mismas condiciones establecidas que en la sacarificación SHF. La fracción sólida post pretratamiento se coloca en matraces Erlenmeyer-modificados de 50 ml y se agrega el buffer acetato de sodio 1x (el cual posee los siguientes nutrientes para proporcionar un medio base: 5 g/l de extracto de levadura, 0,025 g/l de $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ y 0,5 g/l de $(NH_4)_2HPO_4$). El volumen de este buffer se estima considerando el volumen de enzima a agregar (celulasa/celobiasa) hasta completar un volumen de reacción de 20 ml. Además se coloca la cantidad de enzima correspondiente, la cual se estima de forma análoga al caso de Hidrólisis Enzimática. Finalmente se agrega 0,2 g de células de levadura seca para obtener una concentración inicial de 10 g/l de células. Las condiciones de incubación y toma de muestras son idénticas a las del caso de fermentación SHF.

5.2.9 Medición de glucosa

Para estimar la concentración de glucosa se utiliza un kit comercial de ensayo Gluco-Pap marca Randox (GL2623), el cual se basa en la enzima glucosa oxidasa. El procedimiento usado para determinar dichos valores fue el método clásico utilizado en previos estudios [30], [37].

5.2.10 Medición de etanol

Para las mediciones de etanol, se utiliza un equipo llamado cromatógrafo gaseoso marca PerkinElmer modelo Clarus 500 con un detector de llama ionizante FID que se encuentra a 250°C para gasificar las muestras en estado líquido, se utiliza una columna capilar Supelco Nukol de sílica con medidas de 15 m X 0,53 mm X 0,5 μm (catálogo #25326). El gas "carrier" (fase móvil) es helio y los estándares son de etanol diluido. El software integrado *Total Chrome* proporciona la interfaz computador-cromatógrafo. El método utilizado fue el siguiente: Inicialmente el horno se mantiene a 50°C por 2 minutos y luego, mediante una rampa de 20°C/min, se alcanza la temperatura de 150°C manteniéndola por 5 minutos. Para inyectar la muestra se inyectan 5 μl empleando una microjeringa, mostrando como resultado un pico de banda de etanol con un área asociada proporcional a la concentración de etanol presente en la muestra. Se realizan dos mediciones por muestra y se estima la concentración de etanol mediante las curvas de calibración, que se realizan cada vez que se hacen las mediciones. Un ejemplo de curva de calibración se puede observar en el Anexo C.

6. Resultados y discusión

En este capítulo se presenta los resultados obtenidos de los experimentos realizados. En primer lugar se muestra el efecto del pretratamiento (utilizando dos diferentes concentraciones de ácido sulfúrico) en la sacarificación y por consiguiente en la liberación de azúcares de las algas. Posteriormente, se presentan los resultados de la fermentación de los azúcares de las algas a través de la concentración de etanol obtenida según las distintas estrategias utilizadas (SSF y SHF) para las mejores condiciones de pretratamiento.

6.1 Estudios exploratorios sobre condiciones de pretratamiento y sacarificación

Los primeros ensayos tienen como finalidad determinar cuál es la carga enzimática que se utilizará en los ensayos finales. Para esto se realiza el pretratamiento de las muestras y posteriormente se sacarifican, tal como está indicado en el capítulo anterior. En la figura 1 se observan la concentración de glucosa que se obtiene luego de la sacarificación a 3 cargas enzimáticas distintas (10, 20 y 30 FPU) con su respectivo pretratamiento (a 30 y 120°C).

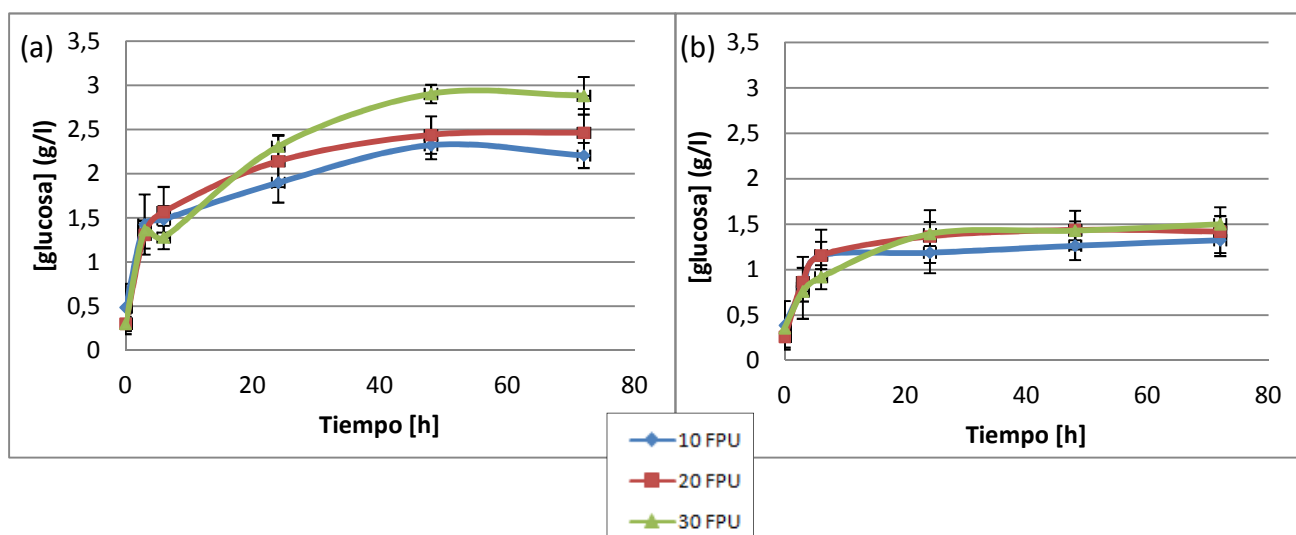


Figura 1: Cinética de sacarificación de *U. rigida* con distintas cargas enzimáticas. Las muestras de macroalga fueron pretratadas por calentamiento a 30°C (a) y 120°C (b). Posteriormente fueron sacarificadas con las cantidades de enzima que se indica.

De la figura 1 se puede observar que ambas curvas (a) y (b) presentan el mismo comportamiento respecto a la liberación de azúcares, es decir, el pretratamiento realizado (ya sea a 30 o 120°C) y la posterior sacarificación producen rompimiento de la pared celular, permitiendo la liberación de glucosa al medio.

Respecto a la carga enzimática utilizada, si bien los resultados muestran que a mayor carga enzimática se obtiene mayor concentración de glucosa en las muestras, la diferencia entre cada caso no es significativa. De acuerdo con lo anterior, la cantidad de enzima utilizada no debiera ser un factor que altere radicalmente los resultados. Por lo tanto, se establece que las pruebas posteriores serán llevadas a cabo utilizando 20 FPU/g, el cual corresponde a la condición intermedia de las 3 probadas.

En esta prueba solo se considera como variable la cantidad de celulasas, dejando constante la concentración de celobiasa. Este factor podría ser significativo en la concentración final de glucosa ya que es la encargada de monomerizar los dímeros de dicha molécula, sin embargo no es parte del presente estudio y podría ser considerado en las siguientes investigaciones.

Los resultados de la figura 1 muestran que el pretratamiento a 30°C es bastante más eficiente (60% aproximadamente) que el pretratamiento a 120°C en la cantidad de glucosa liberada post sacarificación. Es probable que el pretratamiento a altas temperaturas afecte la concentración de glucosa de la muestra. Debido a que esta sección de análisis de resultados corresponde a un estudio exploratorio de la cantidad de enzima a utilizar, el resultado previamente mencionado será discutido más adelante en la sección 6.3. A pesar de lo anterior, se considera que el resultado que satisface los objetivos planteados por esta prueba exploratoria es el efecto de la carga enzimática utilizada.

6.2 Resultados del pretratamiento

A continuación se muestra los resultados del pretratamiento con ácido sulfúrico diluido, es decir, de la concentración de glucosa en la fracción líquida resultante de dicho pretratamiento. Las pruebas se realizaron a 30 y 120°C y con ácido diluido al 2% o en agua. Los resultados de la medición de azúcar en el hidrolizado se muestran en la figura 2. Los resultados de la respectiva sacarificación se presentan en la sección 6.3.

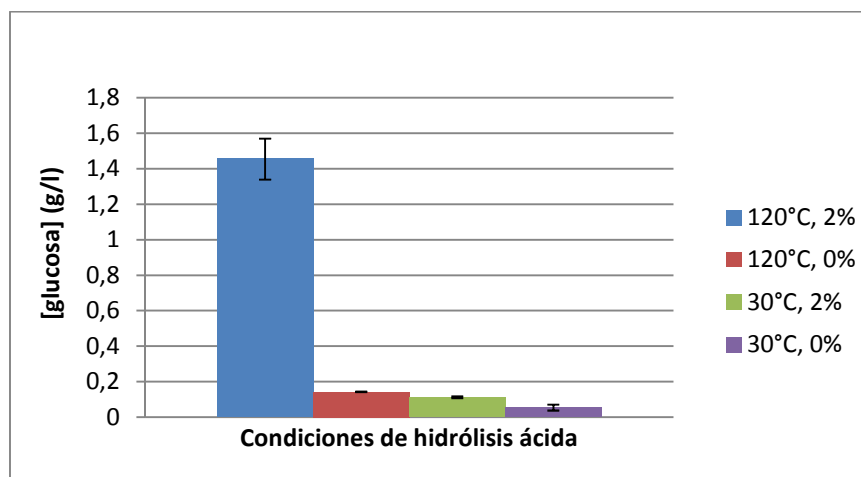


Figura 2. Concentración de azúcar en muestras post pretratamiento con ácido sulfúrico. Todas las muestras fueron realizadas en duplicado y se reportan valores promedio.

En la figura 2 se puede apreciar que las muestras que fueron sometidas a las condiciones más fuertes (2% ácido y 120°C) fueron las que liberaron más azúcar al medio líquido, lo que cualitativamente está dentro de los resultados esperados. Un pretratamiento con esas condiciones es capaz de desestabilizar la estructura de la biomasa lignocelulósica [30] [37].

La fracción líquida de las muestras que fueron tratadas en agua destilada y a 120°C presentan una concentración de azúcar en solución muy baja respecto a la que se comentó anteriormente (no más de un 0,4%). Si bien se espera que una muestra pretratada solo con alta temperatura tenga un rendimiento menor que una tratada con temperatura y ácido, no se espera que exista tanta diferencia entre ellas (9 veces), por lo que se puede considerar al ácido como un factor relevante. La muestra que fue tratada con ácido y 30°C posee niveles similares de concentración de azúcar (entre 0,5 y 1,5 [g/l]), lo que permite establecer que en este caso en particular, un pretratamiento basado solo en temperatura o solo en ácido no es suficiente para obtener una concentración de glucosa considerable en la fracción líquida. Sin embargo, el objetivo principal del pretratamiento no es liberar los azúcares al medio, sino que desestabilizar la pared celular y facilitar la acción de las celulasas en la etapa de sacarificación, por lo que estos bajos rendimientos no interfieren con la finalidad de esta prueba. Finalmente, la muestra que fue tratada con las condiciones más suaves posee un bajo rendimiento, lo cual no difiere a lo esperado inicialmente.

Debido a que el pretratamiento no libera una cantidad considerable de glucosa al medio, la implementación del proceso de producción de etanol a partir de algas no presentaría mayores pérdidas en la separación de sólidos entre el pretratamiento y la sacarificación de las algas. En el caso de que el pretratamiento liberara una mayor cantidad de glucosa, podría considerarse implementar el proceso continuamente.

A pesar de que los resultados de este ensayo están de acuerdo a lo esperado respecto a ensayos de la misma naturaleza en otros tipos de biomasa [30] [37]. En la tabla 3 se muestra el detalle para cada caso.

Tabla 3. Rendimiento del pretratamiento para las distintas condiciones de operación. Estos porcentajes de rendimiento se calculan en base a un máximo, el cual corresponde a la concentración de azúcar obtenida en el estudio de R. González (2012 - Comunicación personal).

Condiciones de T° y ácido sulf.	Rendimiento [%]
120°C, 2%	4,0
120°C, 0%	0,4
30°C, 2%	0,3
30°C, 0%	0,15

De la tabla anterior se observa que los rendimientos no superan el 5%, por lo que se confirma que el pretratamiento aplicado tiene como principal utilidad desestabilizar la estructura cristalina de la celulosa más que la propia liberación de glucosa. Por lo tanto, ahora que la biomasa está pretratada (y teóricamente más susceptible al rompimiento de la pared), está presente la necesidad de aplicar otro método que exponga las moléculas de glucosa al medio, tal como lo hace la hidrólisis enzimática.

Dicha hidrólisis enzimática se aplica a la fracción sólida proveniente del pretratamiento, por lo que el azúcar que no fue liberado en la etapa previa, aun está disponible en dicha fracción

sólida, y no significa que se haya perdido. Por esta razón es que a continuación se presentan los resultados obtenidos de la sacarificación de las muestras recientemente estudiadas.

6.3 Resultados de sacarificación post pretratamiento.

Luego de separar la fracción líquida de la sólida después del pretratamiento, esta última se somete a la sacarificación con enzimas durante 72 horas. Los ensayos se realizan a las 4 condiciones analizadas en el punto 6.2 y sus resultados se muestran en la figura 3.

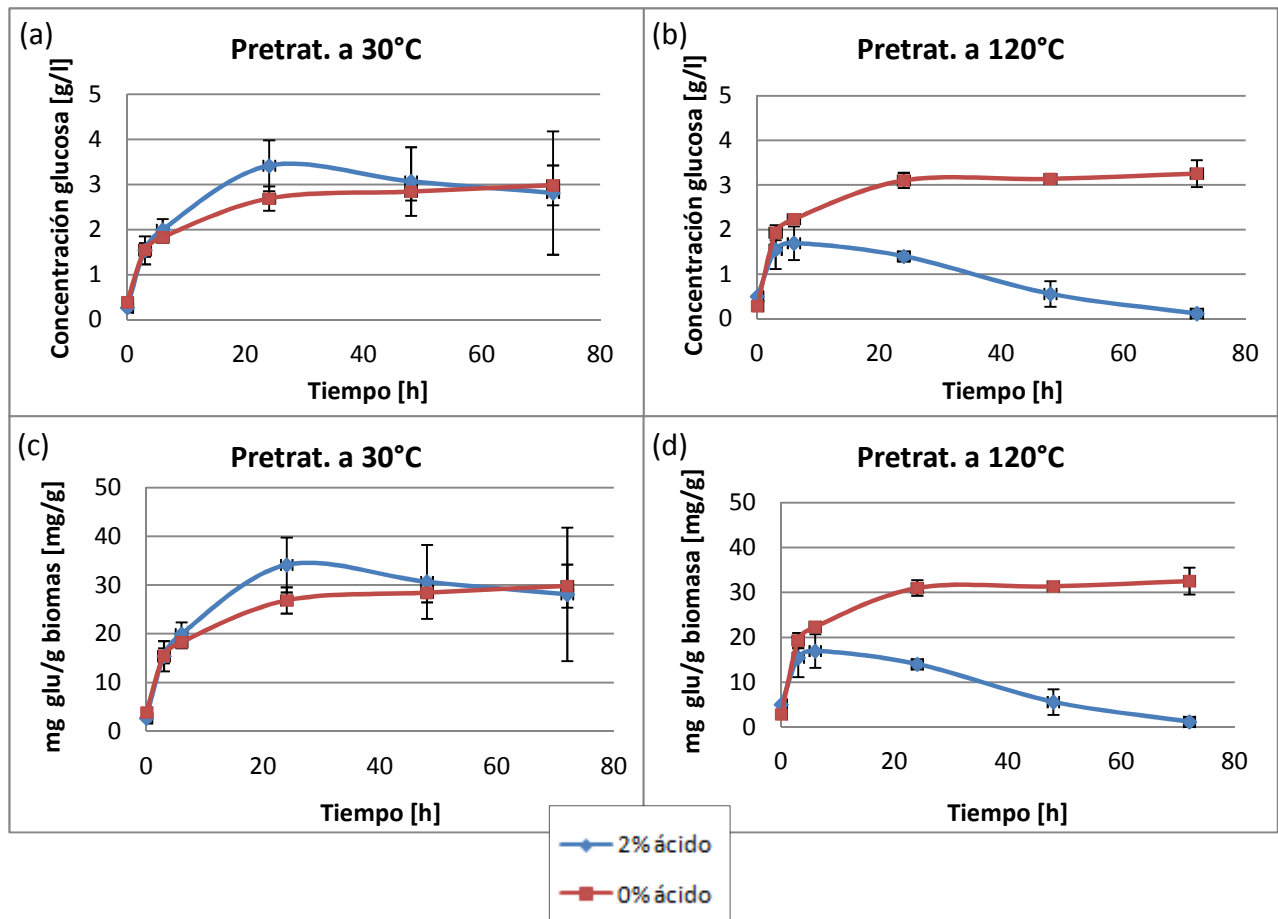


Figura 3. Cinética de sacarificación de *U. rigida* post pretratamiento. Concentración de glucosa en las muestras pretratadas a 30°C (a) o 120°C (b); Cantidad de miligramos de glucosa por gramo de sustrato en la fracción líquida post sacarificación de las muestras previamente pretratadas a 30°C (c) o 120°C (d) según las condiciones del punto 6.2. La carga enzimática de la sacarificación es 20 FPU. Cada ensayo fue realizado en duplicado y se reportan valores promedio.

Para obtener esta cinética, primero se realiza el pretratamiento de las muestras y posteriormente se separa la fracción sólida de la líquida; la fracción líquida se almacena y la sólida es sacarificada. Para comenzar el análisis es importante mencionar que las gráficas de la figura 3 muestran la concentración de glucosa post sacarificación, lo que quiere decir que dichas curvas no incluyen la concentración de glucosa obtenida en la fracción líquida a partir de la etapa de pretratamiento. La finalidad de lo anterior es poder apreciar el efecto de cada operación en forma separada y así discriminar cual es la mejor manera de manejar la biomasa para finalmente fermentar sus azúcares.

En la figura 3 (a) se observa que la concentración máxima de glucosa en la solución hidrolizada es aproximadamente 3 [g/l] con o sin ácido sulfúrico. No existe mayor diferencia entre dichas curvas, por lo que a esta temperatura las condiciones de pretratamiento no son un factor preponderante en la obtención de azúcares. La desviación estándar de las muestras indica un cierto grado de dispersión de los resultados, sin embargo las curvas de cinética se encuentran dentro de lo esperado, es decir, un crecimiento rápido en los primeros tiempos de operación, llegando finalmente a un estado estacionario.

En la figura 3 (b), se muestra un comportamiento muy similar al caso pretratado a 30°C sin ácido. La máxima concentración de glucosa es 3 [g/l], y las primeras horas de reacción son fundamentales (aumento exponencial de la concentración), alcanzando finalmente el estado estacionario. La desviación estándar indica que prácticamente no hay dispersión de los datos respecto a su duplicado, por lo tanto son muy confiables.

En la misma figura 3 (b) pero respecto a la curva que representa las muestras pretratadas con 2% de ácido sulfúrico, se observa que a partir de las 6-12 horas de sacarificación comienza una disminución de la concentración de glucosa. Esta situación puede deberse a diferentes motivos. Uno de ellos es que exista inhibición de la sacarificación. La curva que presenta este decaimiento corresponde a la muestra que fue sometida a las condiciones más extremas, es decir, 120°C y 2% de ácido, por lo que puede ser que durante dicho pretratamiento extremo, se libera algún compuesto (hasta ahora no identificado) que inhibe la acción celulasa de las enzimas, deteniendo de esta forma la reacción. Para poder formular alguna hipótesis sobre que compuesto puede ser el que está afectando la sacarificación se necesita conocer la composición de las algas, la cual es desconocida, por lo que en este caso es preferible no aventurarse en una hipótesis.

Es conocido que la glucosa en caliente con ácido sulfúrico se carboniza y se genera ácido sulfuroso [56]. Esta situación puede que se desarrolle durante el pretratamiento de las muestras previo a la sacarificación a 120°C y con 2% de ácido sulfúrico. La detección de este compuesto se realiza mediante el olfato y en este caso no se encontró ningún olor característico, por lo que en primera instancia se descarta esta opción. El criterio de detección de ácido sulfuroso mencionado está afecto a errores, ya que depende del operario que esté presente durante el ensayo y su percepción. Si bien este podría ser uno de los motivos que provocan una disminución de la concentración total de azúcar, no podría explicar lo que sucede en la figura 3 (b) y (d), en las cuales disminuye la concentración de azúcar durante la sacarificación, proceso en el cual no hay ácido caliente, por lo tanto no se puede producir la carbonización de la glucosa durante dicha hidrólisis enzimática.

Al no conocer la composición exacta de las algas, no se sabe los azúcares que la componen, sin embargo, suponiendo que las algas tengan hemicelulosas o al menos azúcares de 5 carbonos, en presencia de ácido caliente forman furfuralos o derivados [57]. Estos compuestos se pueden remover de la biomasa pretratada, no obstante, en este ensayo la fracción sólida no es lavada, por lo que es posible que haya quedado algo de inhibidores en la biomasa que luego afecten la hidrólisis. Sin embargo, esta inhibición provocaría que la reacción se detuviera, y no sería responsable de que la concentración de glucosa disminuyera en el tiempo, por lo que necesariamente debe existir otra causa adicional que genere dicho comportamiento.

Existen dos escenarios posibles: o efectivamente la concentración de glucosa está disminuyendo, o la medición de la concentración de glucosa está siendo afectada por otro elemento.

El primer escenario sería factible en caso de que existiera contaminación de las muestras, de tal forma de que haya microorganismos consumiendo la glucosa, razón por la cual las curvas presentan dicho decaimiento, sin embargo esta posible causa no tiene mayor sustento y carece de consistencia, ya que en caso de haber contaminación, es poco probable que esta afecte solo a la muestra que fue pretratada a 120°C y ácido sulfúrico y su duplicado debido a que todas las muestras están en las mismas condiciones de operación.

De acuerdo a lo anterior, es probable que el kit de medición utilizado (ver metodologías, sección 5.2.9 – Medición de glucosa) esté siendo afectado o alterado por algún componente de las algas. Este inconveniente está presente solo en las muestras pretratadas en condiciones fuertes, por lo que se puede desprender que dicho pretratamiento tiene un efecto secundario no deseado, el cual es generar un producto o exponer un componente de las algas que interfiera con la medición de glucosa. Es importante destacar que el kit de medición se basa en la actividad de una enzima, glucosa oxidasa, la que podría estar siendo blanco de inhibición. En este caso en particular, se puede considerar que el pretratamiento deja expuesto un componente inhibidor de la glucosa oxidasa, de tal forma que sea más fácil su liberación, ya que su efecto empieza a verse después de las 12 horas de operación. Si el pretratamiento fuera capaz de generar o liberara inmediatamente dicho compuesto inhibidor, su efecto se vería plasmado al comenzar las pruebas.

El rendimiento de la sacarificación con pretratamiento se obtiene de la cantidad de glucosa obtenida en el hidrolizado versus el sustrato utilizado (mg de glucosa/g de biomasa pretratada). Ver figura 3, gráficos (c) y (d). La cantidad total de glucosa por gramo de biomasa pretratada se obtiene de los datos experimentales de R. González (2012 - Comunicación personal). Los resultados se muestran en la tabla 4.

Tabla 4. Cantidad de glucosa liberada y rendimiento posterior al pretratamiento y sacarificación por unidad de sustrato.

	Pretrat. 30°C		Pretrat. 120°C	
	0% ácido	2% ácido	0% ácido	2% ácido
mg glu/g biomasa Obtenido	29,8	34,2	32,6	1,2
mg glu/g biomasa Total	368	368	368	368
Rendimiento	8,10%	9,28%	8,85%	0,32%

Se observa que los rendimientos no superan el 10% respecto a la cantidad total de azúcares que presenta el alga. Los bajos rendimientos obtenidos pueden ser debido al efecto del pretratamiento en las algas, pero además puede ser que la cantidad de enzima utilizada (ya sea celulasa o celobiasa) no sea la adecuada.

Es interesante observar que la muestra pretratada en agua destilada (0% ácido sulfúrico) y a 30°C presenta resultados muy similares a las otras pruebas (excepto la que fue sometida al pretratamiento más fuerte, cuyos valores son muy pequeños). Lo anterior, sumado a los problemas que se generan al pretratar la biomasa, sugieren la realización de otro ensayo

donde la biomasa no sea pretratada, es decir, sea directamente sacarificada. Para esto se utilizan las mismas condiciones que para las muestras pretratadas y sacarificadas.

6.4 Resultados de sacarificación sin pretratamiento.

Debido a que los resultados de la sección anterior muestran que en algunos casos el pretratamiento de las algas puede afectar la concentración final de glucosa, se efectúa una sacarificación directa de macroalga sin pretratamiento. El objetivo de este ensayo es comparar la cantidad de glucosa obtenida con respecto a los resultados de las muestras que si fueron pretratadas. Las condiciones de sacarificación son las que se encuentran en el Capítulo III, sección - 6.2.

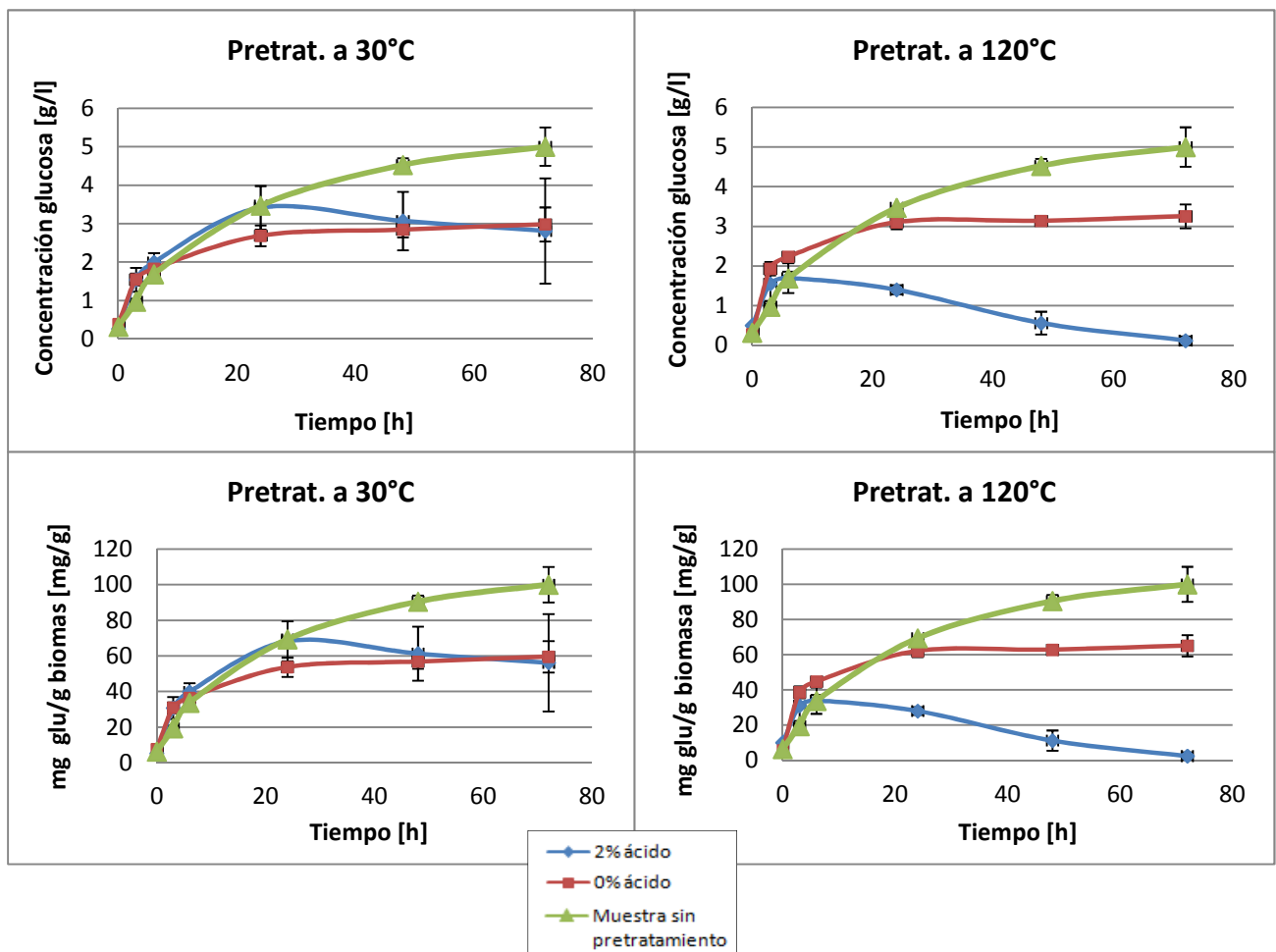


Figura 4. Cinética de sacarificación de *U. rigida* con y sin pretratamiento. Concentración de glucosa en las muestras pretratadas a 30°C (a) o 120°C (b); Cantidad de miligramos de glucosa por gramo de sustrato en la fracción líquida post sacarificación de las muestras previamente pretratadas a 30°C (c) o 120°C (d). La carga enzimática de la sacarificación es 20 FPU. Las curvas azul y roja representan las muestras que fueron pretratadas. La verde representa a la muestra que no fue pretratada. Cada ensayo fue realizado en duplicado y se reportan valores promedio.

Tal como era previsto, la sacarificación de las muestras que no son pretratadas presentan mejores resultados que las muestras que si lo fueron. En este caso, dichas muestras alcanzan

una concentración de 5 [g/l], lo cual es casi el doble que las otras muestras. Esto termina por confirmar el efecto negativo de dicho pretratamiento en la sacarificación de las algas.

El rendimiento de la sacarificación de las muestras sin pretratamiento también aumenta pero no de manera considerable. Lo anterior se observa en la tabla 5.

Tabla 5. Rendimiento de la sacarificación de las muestras con y sin pretratamiento.

	Muestras sin pretratamiento		Muestras con pretratamiento		
	-	30°C, 0%	30°C, 2%	120°C, 0%	120°C, 2%
mg glu/g biomasa Obtenido	100,05	59,64	56,25	65,10	2,37
mg glu/g biomasa Total	368,00	368,00	368,00	368,00	368,00
Rendimiento	27,2	16,2	15,3	17,7	0,6

El máximo rendimiento obtenido es 27% y corresponde a las muestras sin pretratamiento. Si bien este aumenta respecto a las muestras con distintas condiciones de pretratamiento, sigue siendo bajo. En este caso el factor que influye directamente en los resultados corresponde a las condiciones de sacarificación, cantidad de celulasa y/o celobiasa. Es recomendable planificar nuevos estudios considerando esta variable y otros tipos de azúcares que tenga el alga, de tal forma de mejorar el rendimiento de sacarificación.

Además se puede comparar el efecto del ácido sulfúrico en el pretratamiento, ya que para ambas condiciones de temperatura (30 y 120°C) se observa un mayor rendimiento en las pruebas sin ácido, lo que confirma el análisis previo.

A partir de los análisis anteriores, se planifica una estrategia de sacarificación y fermentación simultáneas (SSF) y una de sacarificación y fermentación separadas (SHF). Se analizan los resultados comparativamente. En ambas pruebas la biomasa no será sometida a pretratamiento, tal como lo sugirieron los experimentos anteriores.

6.5 Resultados de estrategia SHF y SSF.

Las muestras de algas son sometidas a dos estrategias de fermentación diferentes: SHF y SSF. Estos ensayos se realizaron sin un pretratamiento de la biomasa, ya que es la condición que presentó mejores resultados en las etapas anteriores. Para el caso SHF, se utiliza como medio el hidrolizado de la sacarificación. Para ambos casos las condiciones de sacarificación son las mismas (cantidad de enzima, temperatura, agitación, etc). El tiempo de fermentación es de 72 horas y los resultados se muestran en la figura 5.

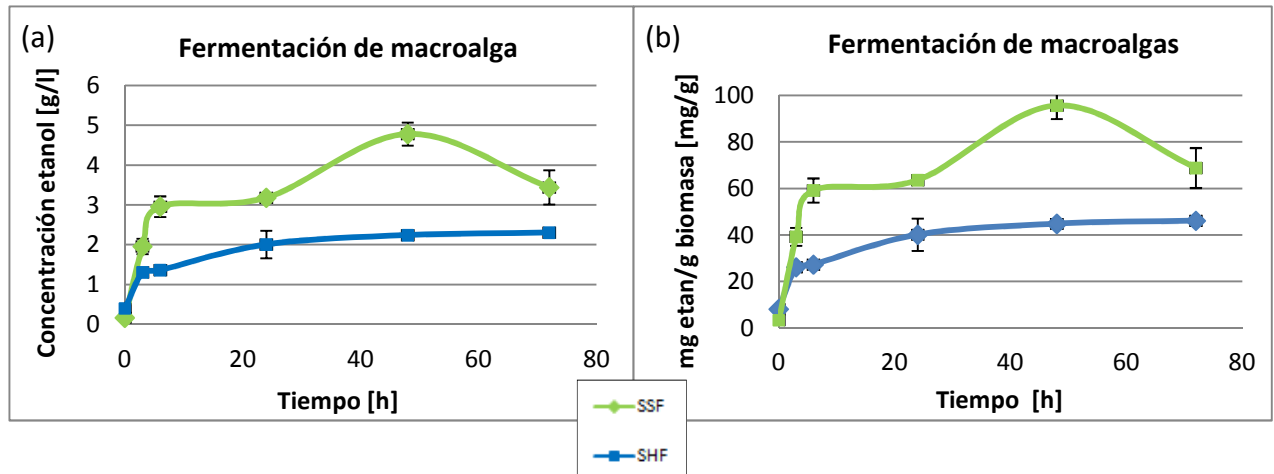


Figura 5. Producción de etanol en experimentos de SSF y SHF en *U. rigida*. (a) Concentración de etanol. (b) Cantidad de miligramos de etanol por gramo de sustrato.

En la figura 5 (a) se puede observar que a partir de las muestras que fueron sacarificadas y fermentadas simultáneamente se puede obtener una mayor concentración de etanol. Ambas curvas, especialmente la de la estrategia SSF, producen etanol desde las primeras horas, lo que indica que las algas poseen azúcares fácilmente hidrolizables (dichas muestras no fueron pretratadas) y por lo tanto, se facilita su fermentación, permitiendo la producción de etanol inmediata.

Respecto al tiempo de operación, la estrategia de sacarificación y fermentación SHF alcanza su estado estacionario a partir de las 40 horas aproximadamente. Por su parte, la figura 5 muestra que la estrategia SSF alcanza un máximo de concentración de etanol a las 48 horas, más aún disminuyendo. Se considera que dicha disminución no corresponde a errores experimentales ni de procedimientos, ya que la curva corresponde a promedios de duplicados y ambas muestras (cada ensayo y su duplicado) presentan la misma cinética; además, las muestras fueron centrifugadas y posteriormente agitadas, para que la medición sea representativa. El decaimiento de la concentración de etanol puede explicarse debido a la acción de la alcohol deshidrogenasa, que es una enzima que utiliza el etanol como sustrato para producir aldehídos o cetonas [58]. Para evitar este inconveniente, es recomendable detener la reacción a las 40-48 horas. De esta forma, se obtiene un máximo de concentración de etanol en ambas estrategias.

A partir de los resultados de la figura 5, se obtiene el rendimiento de cada estrategia, los que se muestran en la tabla 6.

Tabla 6. Rendimiento de las estrategias SSF y SHF a 48 hrs de fermentación. La concentración teórica proviene de la cantidad de glucosa que hay en la muestra (resultados de R. González 2012 - Comunicación personal).

	SSF	SHF
Concentración etanol obtenido [g eta/g material]	0,096	0,046
Concentración etanol total teórico [g eta/g material]	0,188	0,188
Rendimiento	50,8%	24,5%

El rendimiento de la etapa de fermentación en sí es alto, es decir, prácticamente todo el azúcar es fermentado, por lo que se evaluará a continuación corresponde al rendimiento del procedimiento en su totalidad, es decir, la cantidad de etanol producida a partir de la totalidad de los azúcares de la alga (resultados de R. González 2012).

El rendimiento de la estrategia SSF es el doble que el de la estrategia SHF. Esta estrategia presenta algunas ventajas sobre la SHF, tales como que para su ejecución se requieren menor equipamiento (por ejemplo matraces para el caso pequeña escala o tanques para la gran escala), menos cantidad de enzima (la estrategia SSF requiere menos cantidad de enzima que la estrategia SHF para producir una misma cantidad de etanol, debido a su alto mayor rendimiento), y también existe menos posibilidad de contaminación durante la hidrólisis enzimática de las muestras gracias a la presencia de etanol.

La estrategia SSF tiene la desventaja de que para su operación las condiciones de pH y temperatura representan un compromiso entre los óptimos de dichos parámetros para asegurar una hidrólisis enzimática y el crecimiento de un organismo fermentador, sin embargo esta desventaja no se aplica al caso, ya que la etapa de fermentación de las muestras SHF se llevó a cabo en las mismas condiciones de temperatura y agitación. Una alternativa válida y propuesta es repetir las pruebas de SHF en sus condiciones óptimas de temperatura.

Se observa una situación interesante, ya que los resultados de la estrategia SSF presenta un 50,8% de rendimiento respecto la una conversión teórica del 100%, lo que significa que se están fermentando el 50,8% de los azúcares totales, sin embargo en los resultados de la sacarificación de la sección 6.4 se muestra que la cantidad de glucosa que se está liberando corresponde al 27%. Como ya se ha mencionado, dicho rendimiento tiene su base en la composición total de glucosa de la macroalga, por lo que su alto valor puede corresponder a la fermentación de glucosa más la fermentación de otros azúcares no considerados en la composición total de glucosa. Aún así, la estrategia SSF es mejor que la SHF, ya que produce mayor etanol por gramo de biomasa empleado.

6.6 Comparación de resultados con los antecedentes

Los antecedentes que más se asemejan a los resultados obtenidos en el presente trabajo corresponden al documento “Production of high concentrations of bioethanol from seaweeds that contain easily hydrolyzable polysaccharides” [54], el cual menciona que existen algas fácilmente hidrolizables, que no necesitan un pretratamiento. Los resultados de la presente memoria muestran los mismos resultados cualitativos, indicando que un pretratamiento con ácido y temperatura no es necesario y más aún, tiene efectos negativos.

Con respecto a los resultados cuantitativos, el antecedente que presenta los mejores resultados es el mismo mencionado anteriormente. La sacarificación simple de la biomasa produce 43 [g/l] de glucosa, y la concentración de etanol obtenida después de la fermentación no supera los 30 [g/l]. Dichos resultados son más altos que los obtenidos en este trabajo de 5 [g/l] de glucosa y 5 [g/l] de etanol. Sin embargo estos resultados no deberían ser comparables debido a que el antecedente citado no especifica la cantidad de biomasa utilizada. Si se utiliza más biomasa, se obtiene mayor concentración, por lo que los resultados deberían estar normalizados por los gramos de biomasa utilizado, tampoco se especifica el porcentaje p/v de biomasa versus volumen de reacción de la sacarificación, que también afecta los resultados finales.

Además, para poder comparar de mejor forma los resultados obtenidos con los antecedentes, sería de mucha utilidad conocer la composición de los azúcares de la macroalga utilizada, y de esta forma poder estandarizar los rendimientos obtenidos.

Si bien no es recomendable comparar los resultados cuantitativos, si se puede destacar que la macroalga utilizada posee azúcares fácilmente hidrolizables, lo que permite evitar la etapa de pretratamiento, tal como se ha discutido anteriormente.

Conclusiones, Recomendaciones

7. Conclusiones

Después de realizar el trabajo de memoria en producción de etanol a partir de la macroalga *Ulva rigida*, las conclusiones son las siguientes:

La primera etapa del proceso de producción de etanol a partir de *U. rigida* es el pretratamiento. El pretratamiento con condiciones fuertes (2% ácido sulfúrico y 120°C) es el que produce la mayor liberación de glucosa al medio y además provoca un efecto negativo en la posterior hidrólisis enzimática, alejándose del objetivo principal del pretratamiento. El pretratamiento de algas con ácido diluido no mejora el rendimiento de la hidrólisis enzimática en la producción de glucosa. La sacarificación de algas que no son pretratadas presenta una mayor concentración de glucosa en el hidrolizado respecto a las que si fueron pretratadas, obteniendo un rendimiento de sacarificación del 27%.

Se logró fermentar los azúcares de las macroalgas usando *Saccharomyces cerevisiae* Red Star mediante las estrategias SHF y SSF. Esta última presentó los mejores resultados alcanzando un 50% de rendimiento de conversión de glucosa. La estrategia SHF podría optimizarse fermentando en sus condiciones óptimas de temperatura.

Se estudiaron las condiciones necesarias para producir etanol a partir de la macroalga *Ulva rigida*. No es necesario un pretratamiento ya que dicha alga posee azúcares fácilmente hidrolizables, por lo que se deduce sin necesidad de experimentos que la concentración de lignina es muy baja.

Finalmente, no fue posible obtener una caracterización de las macroalgas verdes a utilizar, pero gracias a estudios complementarios (R. González 2012 - Comunicación personal) se logró un acercamiento al conocimiento de la composición total de glucosa, la cual es de 368 [mg/g biomasa].

Además, pese a que este trabajo corresponde a un primer acercamiento a la producción de etanol a partir de algas, el rendimiento obtenido es satisfactorio.

8. Recomendaciones

A partir de las conclusiones anteriormente expuestas, se han considerado algunas recomendaciones que serían útiles en caso de continuar con el estudio de macroalgas y de esta forma mejorar los resultados y rendimientos obtenidos.

- Como se mencionó en la discusión, es probable que algún elemento o compuesto generado en la etapa de pretratamiento afecte el kit de medición de azúcar, por lo que se recomienda realizar un lavado de la biomasa pretratada. De la misma forma, se puede realizar la medición de azúcar con otro kit o se podría realizar la medición de azúcares reductores.
- Un factor que es relevante para la sacarificación de las muestras es la cantidad de celulasa y celobiasa empleada. Para mejorar el rendimiento de sacarificación se pueden realizar estudios de optimización, en los cuales se investigue el efecto de la carga enzimática en la concentración de glucosa luego de la sacarificación.
- Para intentar identificar porque las muestras pretratadas con la condiciones más extremas presenta un decaimiento de la concentración de glucosa, se podría armar un control de una reacción de hidrólisis con una concentración constante de glucosa y agregarle distintas proporciones de algas pretratadas, para ver si se afecta la concentración de glucosa leída por ejemplo a las 72 h, usando un control sin algas.
- La levadura utilizada corresponde a células de levadura seca. A pesar de que los resultados obtenidos mostraron que las levaduras producen etanol inmediatamente, para intentar incrementar la concentración de etanol se puede realizar una propagación y adaptación de la levadura al medio de fermentación, de tal forma que cuando el inóculo se contacte con la biomasa, el rendimiento mejore.
- La estrategia SHF operó en las mismas condiciones de temperatura que la estrategia SHF. Se recomienda ejecutar en dichas condiciones, es decir, 50°C.

9. Referencias

- [1] Consejo nacional del petróleo. Enfrentando el grave problema energético - Una visión integral de la industria del petróleo y el gas natural en el mundo hasta el año 2030 [en línea] <www.npc.org/hard_truths-translations/hardtruths_spanish.pdf> [consulta: 10 febrero 2012]
- [2] JONAH, R. "Peak oil": The eventual end of the oil age [en línea] <http://www.peakoil.net/files/Peak_Oil_the_eventual_end.pdf> [consulta: 10 febrero 2012].
- [3] Comisión Nacional de Energía, Gobierno de Chile. Introducción a Energías Renovables no Convencionales. [en línea] <http://www.cne.cl/cnewww/opencms/03_Energias/Renovables_no_Convencionales/tipos_energia.html> [consulta: 10 febrero 2012].
- [4] LIENQUEO, Ma. Elena. Caracterización de la Biomasa. Material Docente, Curso BT4551 - Energías Renovables a partir de Biomasa. Departamento de Ingeniería Química y Biotecnología. Facultad de Ciencias Físicas y Matemáticas. Universidad de Chile. Semestre Primavera 2010.
- [5] ZANG, W. Automotive fuels from biomass via gasification. Fuel Processing Technology. 91: 866-876, 2010.
- [6] OCHOA, I. Bioetanol, alcohol carburante. [en línea] <http://www.uninorte.edu.co/extensiones/IDS/Ponencias/biocombustibles/BIOETANOL_Ivan_Ochoa1.pdf> [consulta: 11 febrero 2012].
- [7] ZANG, W. Automotive fuels from biomass via gasification. Fuel Processing Technology. 91: 866-876, 2010.
- [8] Greentech Media Research. Third and Fourth Generation Biofuels: Technologies, Markets and Economics Through 2015. [En línea] <<http://www.greentechmedia.com/research/report/third-and-fourth-generation-biofuels>> [Consulta: 12 de febrero de 2012].
- [9] Oceanógrafos Sin Fronteras. Combustible algas, El Uso de las algas para la producción de biocombustibles. [En línea] <http://www.oceanografossinfronteras.org/index.php?option=com_content&task=category§ionid=96&id=261&Itemid=467> [Consulta: 12 de febrero de 2012].
- [10] Comisión Nacional de Energía, Gobierno de Chile. Bioetanol [en línea] <http://www.cne.cl/cnewww/opencms/03_Energias/Otros_Niveles/biocombustible_tipologia/bioetanol.html> [consulta: 12 febrero 2012].
- [11] RFA: RENEWABLE FUELS ASSOCIATION. Ethanol industry statistics. [en línea] <<http://ethanolrfa.org/pages/World-Fuel-Ethanol-Production>> [consulta: 13 de febrero de 2012].

- [12] RFA: RENEWABLE FUELS ASSOCIATION. Climate of Opportunity. [en línea] <http://www.ethanolrfa.org/page/-objects/pdf/outlook/RFAoutlook2010_fin.pdf?nocdn=1> [consulta: 12 febrero 2012].
- [13] WANG, X., LIU, X., WANG, G. Two-stage Hydrolysis of Invasive Algal Feedstock for Ethanol Fermentation" Journal of Integrative Plant Biology, vol. 53 (3), pp. 246-252, 2011.
- [14] CIFUENTES, J., TORRES-GARCIA, M., FRIAS, M. Instituto latinoamericano de la Comunicación Educativa [en línea] <<http://bibliotecadigital.ilce.edu.mx/sites/ciencia/volumen2/ciencia3/090/html/oceano11.html>> [consulta: 12 febrero 2012].
- [15] OILGAE. Reporte de OILGAE, Fuels from Macroalgae. [En línea] <<http://www.scribd.com/doc/30333304/Oilgae-Guide-to-Fuels-From-Macro-Algae#page24>> [Consulta: 13 de febrero 2012].
- [16] WI SG, KIM HJ, MAHADEVAN SA, YANG DJ, BAE HJ. The potential value of the seaweed Ceylon moss (*Gelidium amansii*) as an alternative bioenergy resource. Bioresour Technol 2009; 100:6658–60.
- [17] GE L, WANG P, MOU H. Study on saccharification techniques of seaweed wastes for the transformation of ethanol. Renew Energy 2011; 36:84–9.
- [18] 33rd Symposium on Biotechnology for Fuels and Chemicals (Seattle, USA, May 2-5, 2011). Society for Industrial Microbiology.
- [19] BUSH, R. [US], HALL, K. [US]. Process for the production of ethanol from algae. US patent application. WO2009/067771. C12N1/12. 07/09/2007.
- [20] PEREIRA JUNIOR, N. [BR]. Production of ethanol from algae. Br. WO2007/101172. C12P7/06. 04/06/2009.
- [21] BIBLIOTECA DEL CONGRESO NACIONAL DE CHILE. Biocombustibles. [en línea] <http://www.bcn.cl/carpeta_temas/temas_portada.2006-12-18.7650530977/area_1.2006-218.5249729563> [consulta: 14 febrero 2012]
- [22] CHIBBARO, A. Panorama de las Energías Naturales Renovables y la Agricultura – Una mirada a la Agroenergía en el MERCOSUR y Chile. [en línea] <http://www.odepa.gob.cl/odepaweb/publicaciones/Semcambioclimatico/Santiago/Panorama_ER NC_en_agricultura_101209.ppt> [consulta: 15 febrero 2012]
- [23] BAEZA, J. BIOENERCEL Consorcio Tecnológico. [en línea] <<http://www.cormabiobio.cl/expo2008/www/presentaciones/Expositores%20Silvotecna%20pdf/Jaime%20Baesa.pdf>> [consulta: 15 febrero 2012].
- [24] TRAUB, A. Ministerio de Agricultura, Gobierno de Chile. Políticas sobre biocombustibles en Chile [en línea] <http://www.inia.cl/medios/Descargas/CRI/Platina/Seminarios/S0006/05_biocombustibles_2008_ATraub.pdf> [consulta: 15 febrero 2012].

- [25] PERCIVAL, E. The polysaccharides of green, red and brown seaweeds: Their basic structure, biosynthesis and function. *British Phycological Journal*.
- [26] Aulados, Botánica. Phaeophytas (algas pardas) [en línea] <http://www.aulados.net/Botanica/Curso_Botanica/Algas_pardas/7_Phaeophyta_texto.pdf> [consulta: 18 febrero 2012].
- [27] Acuariofilia. Algas rojas, Rorófitos [en línea] <<http://www.acuariofilia.net/tipos-de-algas/algas-rojas-rodofitos.html>> [consulta: 18 febrero 2012].
- [28] Aulados, Botánica. Phaeophytas (algas pardas) [en línea] <www.aulados.net/Botanica/Curso_Botanica/Algas_verdes/9_Chlorophyta_texto.pdf> [consulta: 18 febrero 2012].
- [29] PERCIVAL, E., & MCDOWELL, R. H. (1967). *Chemistry and enzymology of marine algal polysaccharides*. London: Academic Press.
- [30] JURI, S. 2011 Sacarificación y fermentación simultánea para la producción de bioetanol de segunda generación, mediante pretratamientos alternativos: Líquidos iónicos reciclados y hongos de pudrición blanca. Memoria (Ing. Civil en Biotecnología). Santiago, Universidad de Chile, Facultad de Ciencias Físicas y Matemáticas.
- [31] TAHERZADEH, M., KARIMI, K. Enzyme-based hydrolysis processes for ethanol from lignocellulosic materials: a review. *College of Natural Resources, Department of Wood and Paper Science, North Carolina State University. BioResources*, pp. 707-738, 2007.
- [32] LARSSON, S., PALMQVIST, E., HAHN-HA"GERDAL, B., TENGBORG, C., STENBERG, K., ZACCHI, G., NILVENBRANT, N. "The generation of fermentation inhibitors during dilute acid hydrolysis of softwood". *Enzyme Microb. Technol*, vol. 24, pp. 151–159, 1999.
- [33] HORN, SJ., AASEN, IM., OSTGAARD, K. "Ethanol production from seaweed extract". *Department of Biotechnology, The Norwegian University of Science and Technology. Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, vol. 25, pp. 249-254, 2000. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, vol. 159, pp. 696–707, 2009.
- [34] JING, X., ZHANG, X., BAO, J. "Inhibition performance of lignocelluloses degradation products on industrial cellulase enzymes during cellulose hydrolysis". *State Key Laboratory of Bioreactor Engineering, East China University of Science and Technology*.
- [35] BISSON, L. University of California. Section 3 - The Alcoholic Fermentation, Yeast Biology [en línea] <<http://lfbisson.ucdavis.edu/PDF/VEN124%20Section%203.pdf>> [Consulta: 15 febrero 2012]
- [36] PEJÓ, M. 2010 Bioetanol de paja de trigo: estrategias de integración de las etapas del proceso. Memoria (Doctorado). Madrid, Universidad Complutense de Madrid, Facultad de Ciencias Biológicas.

- [37] NIKLITSHEK, T. 2010 Selección de Condiciones de fermentación de residuos de lenga para la producción de bioetanol. Memoria (Ing. Civil en Biotecnología). Santiago, Universidad de Chile, Facultad de Ciencias Físicas y Matemáticas.
- [38] EKLUND, R., GALBE, M., AND ZACCHI, G. (1995). "The influence of SO₂ and H₂SO₄ impregnation of willow prior to steam pretreatment" *Bioresource Technology*, vol. 52(3), pp. 225-229, 1995.
- [39] KARIMI, K., EMTIAZI, G., AND TAHERZADEH, M. J. (2006a). "Ethanol production from dilute acid pretreated rice straw by simultaneous saccharification and fermentation with *Mucor indicus*, *Rhizopus oryzae*, and *Saccharomyces cerevisiae*" *Enzyme and Microbial Technology*, vol. 40, pp. 138–144, 2006.
- [40] MCMILLAN, J. D., NEWMAN, M. M., TEMPLETON, D. W., AND MOHAGHEGHI, A. (1999). "Simultaneous saccharification and cofermentation of dilute-acid pretreated yellow poplar hardwood to ethanol using xylose-fermenting *Zymomonas mobilis*" *Applied Biochemistry and Biotechnology*, vol. 77-79, pp. 649-665, 1999.
- [41] SUN, Y., AND CHENG, J. (2002). "Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: A review" *Bioresource Technology*, vol. 83(1), pp. 1-11, 2002 .
- [42] OLOFSSON, K., BERTILSSON, M. and LIDÉN. "A short review on SSF – an interesting process option for ethanol production from lignocellulosic feedstocks". *Biotechnology for Biofuels*, vol. 1, pp. 1-14, 2008.
- [43] BALLESTEROS, M., OLIVA, J. M., NEGRO, M. J., MANZANARES, P., AND BALLESTEROS, I. (2004). "Ethanol from lignocellulosic materials by a simultaneous saccharification and fermentation process (SFS) with *Kluyveromyces marxianus* CECT 10875" *Process Biochemistry*, vol. 39(12), pp. 1843-1848, 2004.
- [44] GOLIAS, H., DUMSDAY, G. J., STANLEY, G. A., AND PAMMENT, N. B. (2002). "Evaluation of a recombinant *Klebsiella oxytoca* strain for ethanol production from cellulose by simultaneous saccharification and fermentation: Comparison with native cellobioseutilising yeast strains and performance in co-culture with thermotolerant yeast and *Zymomonas mobilis*" *Journal of Biotechnology*, vol. 96(2), pp. 155-168, 2002.
- [45] HARI KRISHNA, S., JANARDHAN REDDY, T., AND CHOWDARY, G. V. (2001). "Simultaneous saccharification and fermentation of lignocellulosic wastes to ethanol using a thermotolerant yeast" *Bioresource Technology*, vol. 77(2), pp. 193-196, 2001.
- [46] HONG, J., WANG, Y., KUMAGAI, H., and Tamaki, H. (2007). "Construction of thermotolerant yeast expressing thermostable cellulase genes" *Journal of Biotechnology*, vol. 130(2), pp. 114-123, 2007.
- [47] KADAM, K. L. AND SCHMIDT, S. L. (1997). "Evaluation of *Candida acidothermophilum* in ethanol production from lignocellulosic biomass" *Applied Microbiol. Biotechnol.*, vol. 48(6), pp. 709-713, 2001.

[48] SUBHADRA, B., 2010a. "Sustainability of algal biofuel production using integrated renewable energy park and algal biorefinery approach". *Energy Policy*, vol. 38, pp. 5892–5901, 2010.

[49] TAYLOR, G., 2008. "Biofuels and biorefinery concept". *Energy Policy* vol. 36, pp. 4406–4409, 2008.

[50] SUBHADRA, B. "Macro-level integrated renewable energy production schemes for sustainable development". *Energy Policy*, vol. 39, pp. 2193-2196, 2010.

[51] SUBHADRA, B., GRINSON-GEORGE, 2011. "Algal biorefinery-based industry: an approach to address fuel and food insecurity for a carbon-smart world". *Journal of the Science of Food and Agriculture*, vol. 91, pp. 2–13, 2011.

[52] INAPI. Definición de Patente. [En línea] <http://www.inapi.cl/index.php?option=com_content&view=article&id=46&Itemid=20&lang=es#P> [Consulta: 20 de febrero 2012]

[53] KIM, G. [KR]. Method of producing biofuel using sea algae. European patent application. WO2008/105618. C12P 7/06. 04/09/2008.

[54] MITSUNORI YANAGISAWA, KANAMI NAKAMURA, OSAMU ARIGA, KIYOHICO NAKASAKI. "Production of high concentrations of bioethanol from seaweeds that contain easily hydrolyzable polysaccharides". *Bioresource Technology*, vol. 46, pp. 2111-2116, 2011.

[55] GARCÍA, A.E., CARMONA, R.J., LIENQUEO, M.E., SALAZAR, O. "The current status of liquid biofuels in Chile". *Energy*, vol.36, pp. 2077-2084, 2011.

[56] Textos científicos: Propiedades del ácido sulfúrico [en línea] <<http://www.textoscientificos.com/quimica/inorganica/azufre/propiedades-acido-sulfurico>> [consulta: 6 marzo 2012]

[57] ABRIL, N., JORRÍN, J., BÁRCENA, J. Universidad de Córdoba, España. Reacciones coloreadas para la determinación cualitativa de azúcares [en línea] <<http://www.uco.es/organiza/departamentos/bioquimica-biol-mol/pdfs/20%20REACCIONES%20COLOREADAS%20DE%20AZ%3%9ACARES.pdf>> [consulta: 6 marzo 2012]

[58] BIOSCA, J., FERNANDEZ, R., LARROY, C., GONZÁLEZ, E., PARÉZ, X. Universitat Autònoma de Barcelona, España. Descripción y funciones metabólicas de las alcohol deshidrogenasas de *saccharomyces cerevisiae*. Algunos aspectos de ingeniería metabólica aplicados a la fabricación de la cerveza [en línea] <<http://aetcm.es/Revista/155/descripcyfunc155.pdf>> [consulta: 6 marzo 2012]

10. Anexos

Anexo A: Mapa de Sudamérica mostrando el estado de la normativa respecto a biocombustibles.



Imagen A-1. Estado de la normativa respecto a biocombustibles en los países de Sudamérica [24].

Anexo B: Macroalga verde *Ulva rigida*.

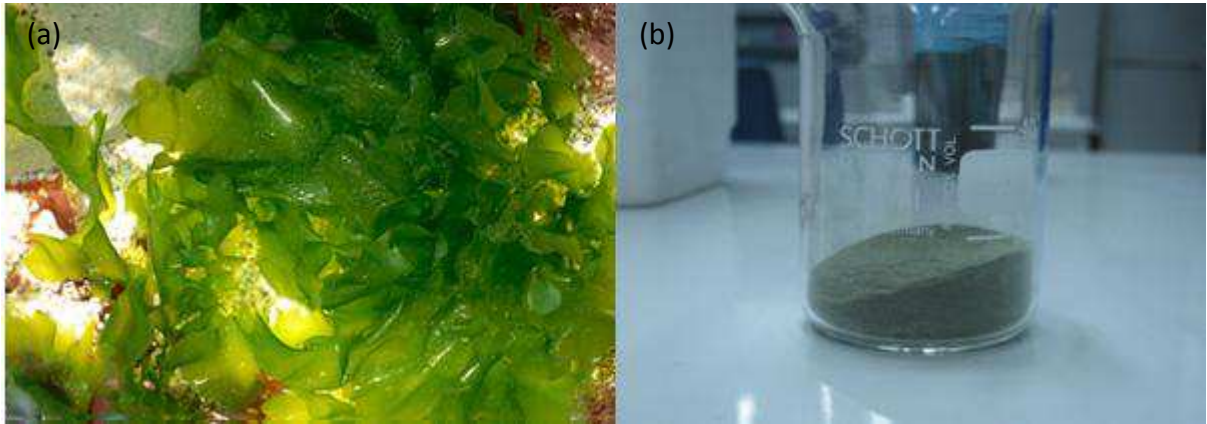


Imagen B-1. (a) Macroalga a utilizar. (b) Muestra acondicionada lista para comenzar las pruebas de producción de etanol a partir de ellas

Anexo C: Curva de calibración de etanol v/s Área de integración. Resultados de la cromatografía gaseosa.

Para realizar esta curva, se preparan distintas diluciones de etanol a concentraciones 1, 5 y 10 [g/l] y se mide el área de integración de dichas concentraciones. El resultado de la curva se observa en la imagen C-1.

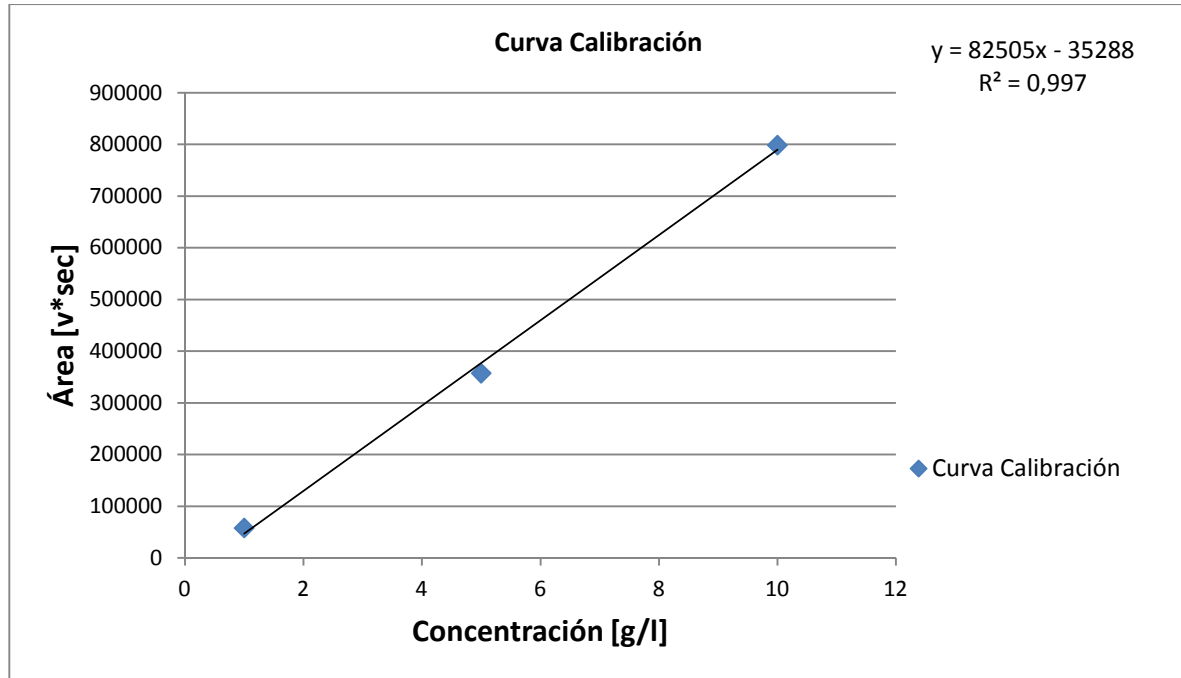


Imagen C-1. Curva de calibración de concentración de etanol v/s área de integración.

Anexo D: Montajes experimentales

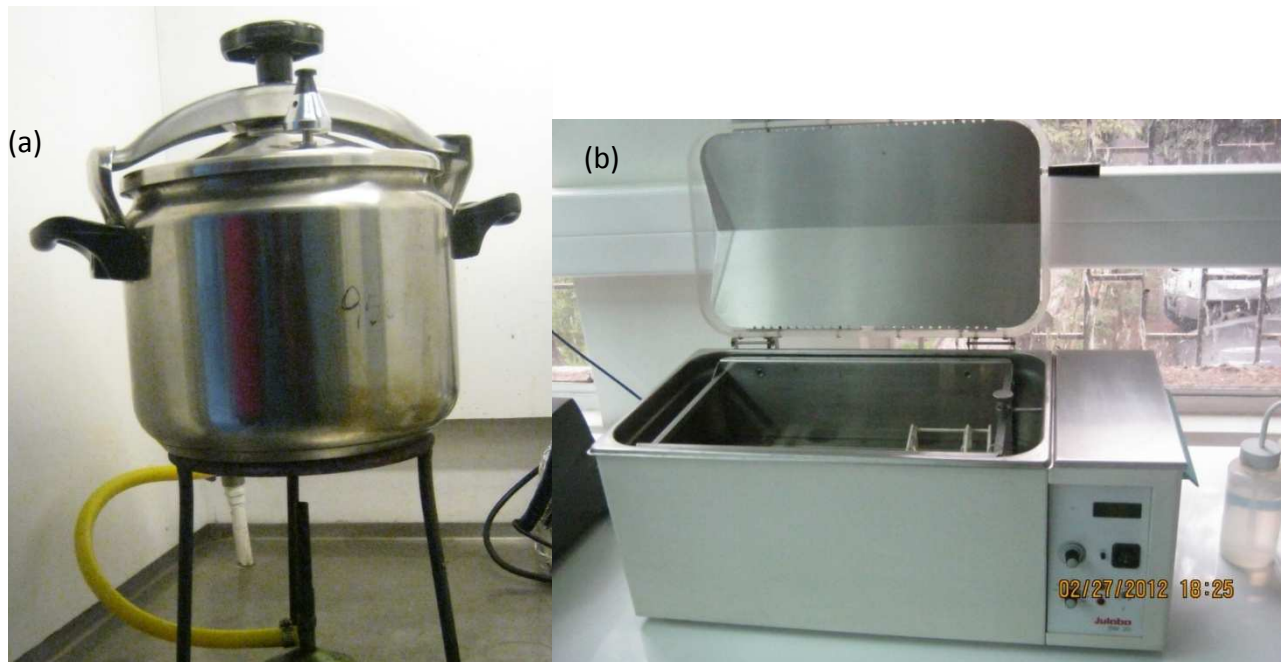


Imagen D-1. Montaje pretratamiento con ácido diluido. (a) Montaje utilizado como autoclave para alcanzar altas temperaturas. (b) Baño utilizado para pretratar muestras a 30°C.

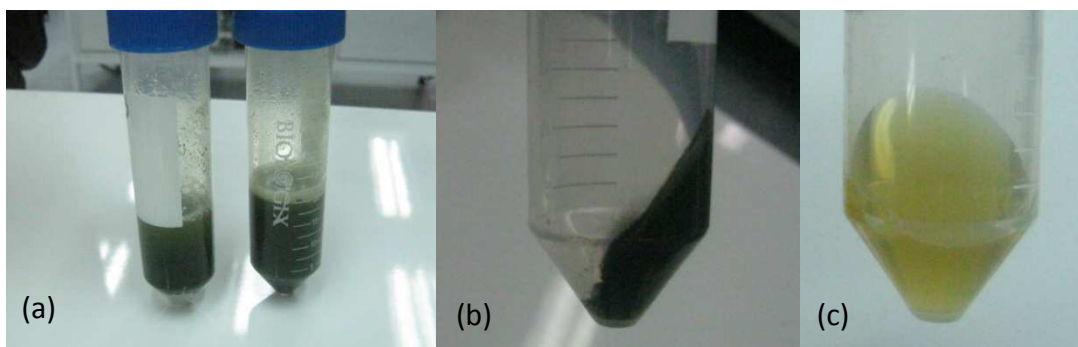


Imagen D-2. Muestras del pretratamiento. (a) Muestras previo al pretratamiento con ácido diluido. (b) Fracción sólida obtenida por centrifugación post hidrólisis ácida. (c) Fracción líquida obtenida por centrifugación post hidrólisis ácida.



Imagen D-3. Montaje de la neutralización post hidrólisis ácida. Durante la neutralización se va midiendo pH.

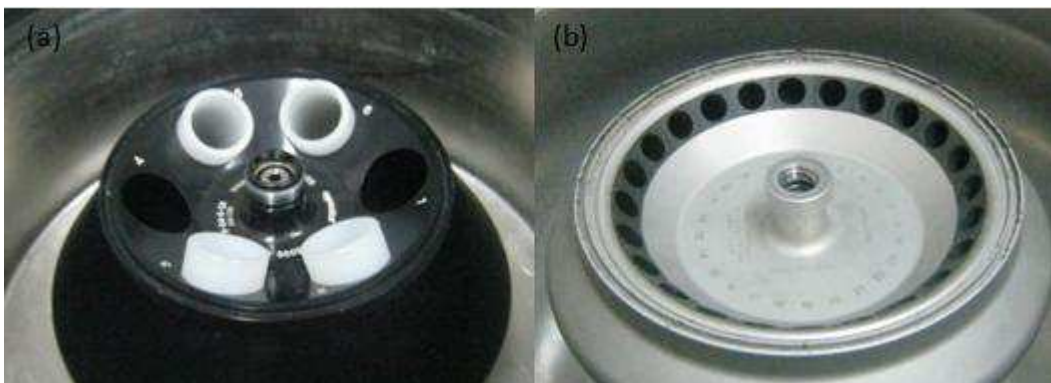


Imagen D-4. Rotores de centrifugación. (a) Rotor utilizado para centrifugar muestras post hidrólisis ácida. (b) Rotor empleado para centrifugar muestras para medición de glucosa y etanol.



Imagen D-5. Matraces Erlenmeyer-modificados. (a) Matraz antes de iniciar la fermentación (estrategia SSF y/o SHF). (b) Vista lateral del matraz durante fermentación (estrategia SSF y/o SHF). (c) Vista superior del matraz durante fermentación (estrategia SSF y/o SHF).

Anexo E: Memoria de cálculo de los rendimientos

E.1 Sacarificación muestras sin pretratamiento.

A partir de los datos experimentales de R. González (2012 - Comunicación personal), se sabe que:

$$\text{Cantidad de glucosa} = \frac{g \text{ glucosa}}{g \text{ biomasa}} = 0,368 = 368 \frac{mg \text{ glucosa}}{g \text{ biomasa}}$$

La medición de glucosa indica que las muestras poseen una concentración máxima de 5002 [mg/l]. El volumen de reacción en el cual se lleva a cabo la reacción es de 4 [ml]; la biomasa utilizada es 0,2 [g].

$$5002 \left[\frac{mg}{l} \right] = \frac{5002 \left[\frac{mg \text{ glucosa}}{l} \right] \times 0,004[l]}{0,2[g \text{ biomasa}]} = 100,04 \left[\frac{mg \text{ glucosa}}{g \text{ biomasa}} \right]$$

Rendimiento:

$$\text{Rendimiento} = \left[\frac{mg \text{ glucosa obtenido}}{mg \text{ glucosa total}} \right] \times 100 = \frac{100,04}{368} \times 100 = 27,2\%$$

E.2 Rendimiento fermentación SSF y SHF

A partir de los datos experimentales de R. González (2012 - Comunicación personal), se sabe que:

$$\text{Cantidad de glucosa} = \frac{g \text{ glucosa}}{g \text{ biomasa}} = 0,368 = 368 \frac{mg \text{ glucosa}}{g \text{ biomasa}}$$

La masa de biomasa fermentada es 1 [g]. Asumiendo un 100% de conversión (liberación de glucosa), toda la glucosa se libera (368 [mg]). Haciendo balance de moles (P.M glucosa= 180,159 [g/mol]):

$$0,368 [g \text{ glucosa}] = 0,002043 [mol \text{ glucosa}]$$

Estequiométricamente, 2 moles de etanol equivalen a uno de glucosa, por lo que se tiene:

$$0,002043 [mol \text{ glucosa}] = 0,004085 [mol \text{ etanol}]$$

El peso molecular del etanol es 46,07 [g/mol], por lo que:

$$0,004085 [mol \text{ etanol}] = 0,188 [g \text{ etanol}] \text{ (100\% de liberación)}$$

A partir de los resultados de la fermentación, se conoce la concentración de etanol en solución y su masa.

Tabla E-1. Concentración y masa de etanol para estrategia SSF y SHF.

	Pruebas SSF	Pruebas SHF
Concentración etanol [g/l]	4,70	2,31
Masa etanol [g]	0,09	0,05

La masa de etanol obtenida en los ensayos se compara con la masa de etanol total posible de obtener (0,188 [g etanol]) y se calcula el rendimiento.

$$Rendimiento_{SSF} = \frac{\text{masa etanol obtenido}}{\text{masa etanol total}} = \frac{0,09 [g]}{0,188 [g]} = 50\%$$

$$Rendimiento_{SHF} = \frac{\text{masa etanol obtenido}}{\text{masa etanol total}} = \frac{0,05 [g]}{0,188 [g]} = 24,5\%$$