UNIVERSIDAD NACIONAL DE MOQUEGUA

ESCUELA PROFESIONAL DE:
INGENIERÍA AMBIENTAL

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

TESIS

PRESENTADA POR:

BACHILLER DAYSI ELIZABETH BUTRÓN RUIZ

Para optar el Título Profesional de:

INGENIERO AMBIENTAL

ILO-PERÚ

2019

UNIVERSIDAD NACIONAL DE MOQUEGUA
UNAM
CERTIFICA: Que el presente documento ES COPIA FIEL DEL ORIGINAL, al que me remito para los fines pertinentes
Moquegua 30 DIC. 2019
Abog. Guillermo Santiago Kuong Cornejo
SECRETARIO GENERAL

UNIVERSIDAD NACIONAL DE MOQUEGUA

CARRERA PROFESIONAL DE INGENIERÍA AMBIENTAL

ACTA DE SUSTENTACIÓN.

El Jurado suscribiente ha calificado el trabajo de Tesis,

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

PRESIDENTE Dr. EDUARDO LUIS FLORES QUISPE

MIEMBROS Dr. HEBERT HERNAN SOTO GONZALES

M.Sc. PAULINO FLAVIO RIOS ZAPANA

ASESOR Mg.Sc. MARIO ROMAN FLORES ROQUE

PRESENTADO POR EL BACHILLER DAYSI ELIZABETH BUTRON RUIZ

DE LA PROMOCIÓN:

CUYOS RESULTADOS HAN SIDO LOS SIGUIENTES:

CALIFICATIVO DEL TRABAJO 15 (QUINCE)

CALIFICATIVO DE LA SUSTENTACIÓN 15 (QUINCE)

CALIFICATIVO FINAL 15 (QUINCE)

POR LO EXPUESTO, EL BACHILLER DAYSI ELIZABETH BUTRON RUIZ

HA SIDO DECLARADO EXPEDITO PARA QUE SE LE CONFIERA EL TÍTULO PROFESIONAL DE:

INGENIERO AMBIENTAL

EN FE DE ELLO QUEDA ASENTADA LA PRESENTE ACTA

Ilo, a los 22 días de NOVIEMBRE de 2019

Presidente
Dr. EDUARDO LUIS FLORES QUISPE

Miembro
HEBERT H. SOTO GONZALES

Miembro
M.Sc. Paulino F. Rios Zapana

UNIVERSIDAD NACIONAL DE MOQUEGUA SECRETARIO

A Dios por haberme brindado la vida.

A mis padres por ser el pilar fundamental de toda mi educación, siendo mi familia el motor de mi vida, ya que siempre estuvieron a mi lado en cada momento dándome seguridad.

Al amor de mi vida por estar conmigo en todo momento dándome aliento, fortaleza. Y seguridad en esta etapa de mi formación.

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional de Moquegua por acogerme en sus aulas, para mi formación profesional.

A los Docentes de la Universidad Nacional de Moquegua por sus enseñanzas y conocimientos.

Al MSc. Mario Román Flores Roque, por su asesoramiento en la ejecución del trabajo de investigación.

A mi familia por su apoyo incondicional durante mi formación profesional y en la ejecución de mi tesis.

RESUMEN

La principal fuente energética mundial está basada en combustibles fósiles como el petróleo y es ampliamente conocido que las reservas petroleras mundiales se reducen cada año, dándole un mayor espacio al uso de nuevas alternativas energéticas de carácter renovable y con menor impacto en el medio ambiente, al reducir los gases del efecto invernadero. Es por ello que los biocombustibles constituyen una opción, además considerando que en el país los gasoholes (de 97, 95, 90, 84 octanos), tienen en su composición 7,8 % de etanol, este trabajo de investigación tiene como objetivo la obtención de bioetanol a partir de la biomasa de la macroalga *Macrocystis pyrifera*, mediante el proceso de hidrólisis y fermentación.

Los resultados del estudio concluyen que mediante el tratamiento con H_2SO_4 a [2%] v/v sometido a 30°C y 120°C, no hubo presencia de azúcares reductores, sin embargo la macroalga aplicada con la enzima celulasa sí hubo hidrólisis en azúcares reductores; obteniéndose, en los procesos de hidrólisis y fermentación separada, en promedio 0,36 (ml bioetanol /g macroalga). Y a través del proceso de hidrólisis enzimática y fermentación simultánea en promedio 0,46 (ml bioetanol /g macroalga). Para la evaluación estadística de los resultados, se efectuó el análisis de variancia (ANOVA), con prueba de significancia de Fisher al 5%, para diferenciar la variación entre tratamientos, concluyendo que no hay diferencia entre ambos tratamientos.

Con el presente trabajo de investigación, se puede aportar que sí es posible obtener bioetanol a partir de la macroalga *Macrocystis pyrifera* que es nativa del Perú, y además la biomasa se puede producir mediante la maricultura en la región Moquegua para la producción de bioetanol.

Palabras clave: Macroalga, bioetanol, fermentación, *Macrocystis pyrifera*.

ABSTRACT

The main world energy source is based on fossil fuels such as oil and it is widely known that world oil reserves are reduced every year, giving more space to the use of new energy alternatives of a renewable nature and with less impact on the environment, by Reduce greenhouse gases. that is why biofuels are an option, also considering that in the country, diesel (97, 95, 90, 84 octane) have 7.8% ethanol in its composition, this research work aims to obtain bioethanol from the *Macrocystis pyrifera* macroalgae biomass, through the process of hydrolysis and fermentation.

The results of the study conclude that by treatment with H_2SO_4 at [2%] v / v subjected to 30 ° C and 120 ° C, there was no presence of reducing sugars, however the macroalgae applied with the cellulase enzyme did have hydrolysis in sugars reducers; obtaining, in the processes of hidrólisis y fermentación separada, on average 0.36 (ml bioethanol / g macroalgae). And through the process of enzymatic hidrólisis y fermentación simultanea on average 0.46 (ml bioethanol / g macroalgae).

For the statistical evaluation of the results, the analysis of variance (ANOVA) was performed, with Fisher significance test at 5%, to differentiate the variation between treatments, concluding that there is no difference between the treatments.

With the present research work, it can be said that it is possible to obtain bioethanol from the macroalgae *Macrocystis pyrifera* that is native to Peru, and in addition the biomass can be produced through mariculture in the region Moquegua for the production of bioethanol.

Keywords: Macroalgae, bioethanol, fermentation, *Macrocystis pyrifera.*

LISTA DE DEFINICIÓN DE TÉRMINOS Y ABREVIACIONES

H_2SO_4	Ácido Sulfúrico.
ml	Mililitro.
g	gramo.
v	volume.
SSF	Sacarificación y fermentación simultanea.
SHF	Sacarificación y fermentación separada.
CO_2	Dióxido de carbono.
EtOH	Etanol.
$C_6H_{12}O_6$	Glucosa.
C_2H_5OH	Etanol.
DCA	Diseño completamente al azar.
Ho	Hipótesis nula.
Ha	Hipótesis alterna.
NaOH	Hidróxido de sodio.
$C_6H_8O_6$	Ácido ascórbico.

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN 1

CAPÍTULO I 2

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA 2

1.1.DESCRIPCIÓN DE LA REALIDAD PROBLEMÁTICA 2

1.2.FORMULACIÓN DEL PROBLEMA 4

1.2.1. INTERROGANTES 6

INTERROGANTE GENERAL 6

INTERROGANTES ESPECÍFICOS 6

1.3.JUSTIFICACIÓN 7

1.4.OBJETIVOS 8

OBJETIVO GENERAL 8

OBJETIVOS ESPECÍFICOS 9

1.5.HIPÓTESIS 9

HIPÓTESIS GENERAL 9

HIPÓTESIS ESPECÍFICAS 10

CAPÍTULO II 11

MARCO TEÓRICO 11

2.1. ANTECEDENTES DEL ESTUDIO 11

2.2. BASES TEÓRICAS 18

2.2.1. MACROALGA *Macrocystis pyrifera* 18

2.2.1.1. COMPOSICIÓN DE *Macrocystis pyrifera* 23

2.2.1.2. CULTIVO DE MACROALGAS PARA BIOCOMBUSTIBLES 25

2.2.1.3. PESQUERÍA DE MACROALGAS EN EL PERÚ. 26

2.2.2. FERMENTACIÓN 27

2.2.3. HIDRÓLISIS ÁCIDA 29

2.2.4. HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA 30

2.3. DEFINICIÓN DE TÉRMINOS 32

CAPÍTULO III 33

MARCO METODOLÓGICO 33

3.1. TIPO Y DISEÑO 33
3.1.1 TIPO DE INVESTIGACIÓN 33
3.1.2 DISEÑO DE INVESTIGACIÓN 34
3.2. NIVEL DE INVESTIGACIÓN 35
3.3. OPERACIONALIZACIÓN DE VARIABLES 35
3.3.1. Operacionalización de las variables independientes. 35
3.3.2. Variable Dependiente. 36
3.4. POBLACIÓN Y MUESTRA 38
3.4.1. POBLACIÓN 38
3.4.2. MUESTRA 39
3.5. TÉCNICAS E INSTRUMENTOS PARA LA RECOLECCIÓN DE DATOS 39
3.5.1. TÉCNICAS 39
3.5.1.1. LUGAR DE ESTUDIO 40
3.5.1.2. MATERIA PRIMA 40
3.5.1.3. ENZIMAS 41
3.6. MÉTODOS Y TÉCNICAS PARA LA PRESENTACIÓN Y ANÁLISIS DE DATOS. 47
CAPÍTULO IV 48
RESULTADOS 48
DISCUCIONES 61
CONCLUSIONES 63
RECOMENDACIONES 64
REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS 65
ANEXOS 71

INDICE DE FIGURAS

FIGURA 1: MACROALGAS DE IMPORTANCIA COMERCIAL DEL PERÚ. 21
FIGURA 2: MACROCYSTIS PYRIFERA 22
FIGURA 3: DOS TIPOS DE MONÓMEROS PRESENTES EN LA PARED CELULAR. 24
FIGURA 4: ACOPIO DE MACROALGAS VARADAS. 27
FIGURA 5: ESQUEMA DEL CAMBIO ESTRUCTURAL DEL MATERIAL LIGNOCELULÓSICO DEBIDO A LA ETAPA DE PRETRATAMIENTO. 29
FIGURA 6: *ESQUEMA DE LOS PROCESOS REALIZADOS PARA LA OBTENCIÓN DE BIOETANOL A PARTIR DE LA MACROALGA ……30*
FIGURA 7: UBICACIÓN DE LA ZONA DE COLECTA DE LA MACROALGA M. PYRIFERA, EN LA PROVINCIA DE ILO. 38
FIGURA 8: FOTOGRAFÍA DE LA MACROALGA M. PYRIFERA. TIENE LAS SIGUIENTES DIMENSIONES 1.25CM DE LARGO Y 30CM DE ANCHO. 40
FIGURA 9: DIAGRAMA DE FLUJO DE HIDRÓLISIS ÁCIDA. 43
FIGURA 10: COMPARACIÓN DE RESULTADOS OBTENIDOS EN EL PROCESO DE HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA Y FERMENTACIÓN SIMULTÁNEA Y EL PROCESO DE HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA Y FERMENTACIÓN SEPARADA. 54
FIGURA 11: COMPARACIÓN DE PROMEDIOS DE LOS PROCESOS DE HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA Y FERMENTACIÓN SIMULTÁNEA (SSF) Y EL PROCESO DE HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA Y FERMENTACIÓN SEPARADA (SHF). 55
FIGURA 12: PRUEBA DE NORMALIDAD CON LOS RESULTADOS OBTENIDOS EN EL PROCESO DE HIDRÓLISIS Y FERMENTACIÓN SEPARADA. 57
FIGURA 13: PRUEBA DE NORMALIDAD CON LOS RESULTADOS OBTENIDOS EN EL PROCESO DE HIDRÓLISIS Y FERMENTACIÓN SIMULTÁNEA. 58
FIGURA 14: MUESTRA DE BIOMASA DE MACROALGAS MACROCYSTIS PYRIFERA. 90
FIGURA 15: MUESTRA TAMIZADA OBTENIDA, PARA REALIZAR EL PROCESO DE SACARIFICACIÓN Y FERMENTACIÓN SEPARADA Y SIMULTÁNEA. 91
FIGURA 16: ANÁLISIS DE HIDRÓLISIS ÁCIDA. 92

FIGURA 17: MEDICIÓN DE PH DEL TRATAMIENTO DE HIDRÓLISIS ÁCIDA. ARROJANDO LAS MUESTRAS PH 4,5, 4,5 ÓPTIMO PARA EL PROCESO. 92
FIGURA 18: ANÁLISIS DE SACARIFICACIÓN Y FERMENTACIÓN SEPARADA Y SIMULTÁNEA EN EL LABORATORIO DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL DE MOQUEGUA FILIAL ILO. 93
FIGURA 19: TRATAMIENTO DE HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA. 94

ÍNDICE DE TABLAS

TABLA 1: 25
TABLA 2: 37
TABLA 3..... 44
TABLA 4: 49
TABLA 5..... 51
TABLA 6: 53
TABLA 7:..... 59

INTRODUCCIÓN

Las fuentes de combustibles fósiles son recursos no renovables y agotables, en cambio las energías renovables tienen la ventaja de sustentabilidad, es decir la garantía de mantener la seguridad y diversidad del suministro energético y la posibilidad de su uso indefinido en el tiempo. Una de estas energías renovables, obtenidas por vía biotecnológica, es el bioetanol a partir de biomasa de diferentes procedencias, en este trabajo de investigación se plantea la posibilidad de producción de bioetanol a partir de la macroalga *Macrocystis pyrifera*, la cual es una alga nativa de la costa sur del Perú, y hoy en día existe la tecnología para la producción de biomasa a gran escala a través de la maricultura, asimismo esta macroalga posee alto porcentaje de carbohidratos por lo cual se presenta como una alternativa importante para la producción de bioetanol. Otro aspecto a considerar es que, la producción de bioetanol a partir de algas, no usa tierras agrícolas que están destinadas para la producción de alimentos.

CAPÍTULO I

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

1.1. DESCRIPCIÓN DE LA REALIDAD PROBLEMÁTICA

A nivel mundial la principal fuente de energía se produce a partir combustibles fósiles como petróleo y gas natural y los principales problemas que esto presenta son la reducción de las reservas petroleras mundiales y la producción de gases contaminantes por la quema de los combustibles fósiles como son los gases del efecto invernadero. Frente a esta problemática energética, el desarrollo de fuentes de energía alternativo y renovable como los biocombustibles son una necesidad.

Los biocombustibles se presentan como una opción a los combustibles fósiles, como fuente de energías renovables, debido a que se pueden producir a partir de materiales biológicos. La biomasa puede provenir de cultivos agrícolas, madera, desechos orgánicos vegetales, excremento de animales e inclusive algas. Los biocombustibles se pueden clasificar en primarios y secundarios, los primarios son biocombustibles no procesados como la leña, desechos agrícolas y aserrín de madera, los cuales pueden ser usados para calefacción y generar electricidad; los biocombustibles secundarios son

obtenidos al procesar la biomasa y abarca una variedad amplia de productos como, bioetanol, biometanol, biodiesel y biogás. Los biocombustibles obtenidos a partir de fuentes biológicas pueden ser: biodiesel (microalgas, soya), bioetanol (maíz, caña de azúcar), etc.

En el Perú, el porcentaje en volumen de alcohol carburante etanol (EtOH) en la mezcla gasolina - alcohol carburante es de 7,8% y se le denomina Gasohol, según el grado de octanaje: Gasohol 97 Plus, Gasohol 95 Plus, Gasohol 90 Plus y Gasohol 84 Plus.

Por otro lado, en la provincia de Ilo, se realizaron proyectos a cargo del gobierno regional de Moquegua e IMARPE Ilo, que se ejecutaron con la finalidad de implementar el cultivo de la *Macrocystis pyrifera* como una opción para el desarrollo de la maricultura con resultados exitosos en cuanto a la producción de biomasa, sin embargo, no despega por falta de mercado para la macroalga.

Frente a esta situación este trabajo de investigación plantea la posibilidad de obtención de bioetanol a partir de la macroalga marina *Macrocystis pyrifera*, que en su composición reporta un alto contenido de carbohidratos, que podrían ser hidrolizados en azúcares fermentables para la obtención de bioetanol.

1.2. FORMULACIÓN DEL PROBLEMA

En el Perú, los combustibles como Gasohol 97 Plus, Gasohol 95 Plus, Gasohol 90 Plus y Gasohol 84 Plus, son mezclas de gasolina y etanol (EtOH), el etanol (EtOH) representa el 7,8% en todos los gasoholes de acuerdo al Decreto Supremo Nº 021-2007-EM, este biocombustible proviene generalmente de cultivos agrícolas como caña de azúcar, trigo, maíz, entre otros; por otro lado la producción masiva de cultivos para la obtención de biocombustibles podría generar problemas de deforestación, generar escases de alimentos provenientes de trigo o maíz, problemas de contaminación de fertilizantes y pesticidas usados para el cultivo intensivo.

En la región Moquegua y específicamente en Ilo, nuestro parque automotor usa gasoholes con bioetanol producido a base de la caña de azúcar, en el norte del Perú. De ser posible la obtención industrial a base de la macroalga, podría generarse una industria en la provincia de Ilo, similar a la existente en el Norte (Maple etanol y Caña brava).

Las macroalgas marinas especialmente las laminarias como la *Macrocystis pyrifera* tienen un alto contenido de compuestos ricos en azúcares

como los polisacáridos que pueden ser usados para la producción de bioetanol por fermentación. Ya existen experiencias de cultivo de la macroalga *Macrocystis pyrifera* en la Provincia de Ilo ejecutados por el Gobierno Regional de Moquegua y el Laboratorio Costero de Ilo del IMARPE.

En el año 2012; se desarrolló el proyecto "Fortalecimiento de la Pesquería del Recurso Macroalga en la provincia de Ilo, Región Moquegua" ejecutado por el Gobierno Regional de Moquegua, producto de esta experiencia; se obtuvo como resultado el cultivo en sistema suspendido long line de *Macrocystis pyrifera*, en la provincia de Ilo, obteniendo buenos resultados y demostrando la factibilidad de su cultivo para la producción de biomasa. En el año 2016, el Laboratorio costero del IMARPE en Ilo, gana el concurso de Investigación Aplicada y Desarrollo Tecnológico en Problemas de Interés Público con el proyecto "Producción de semillas y cultivo en sistema suspendido de macroalgas de interés comercial en el litoral marino de Ilo - Moquegua"; este concurso es convocado por el Programa Nacional de Innovación para la Competitividad y Productividad del Ministerio de la Producción (INNOVATE), el objetivo de este proyecto es producir semillas (plántulas) de macroalgas de interés comercial como *Macrocystis pyrifera*, *Lessonia trabeculata y Lessonia nigrescens* en laboratorio y desarrollar su cultivo en medio natural.

En este contexto, actualmente no se conocen las condiciones para obtener bioetanol a partir de la macroalga *Macrocystis pyrifera*.

1.2.1. INTERROGANTES

INTERROGANTE GENERAL

- ¿Con cuál proceso de hidrólisis y fermentación se obtiene bioetanol a partir de la macroalga *Macrocystis pyrifera*?

INTERROGANTES ESPECÍFICAS

- ¿Qué concentración de 0% y 2% v/v de H_2SO_4 a dos temperaturas de 30°C y 120°C son las más adecuadas para la hidrólisis ácida de la macroalga *Macrocystis pyrifera*?

- ¿Cuáles son los niveles de producción de bioetanol mediante los procesos de hidrólisis enzimática y fermentación separada en comparación con el proceso de hidrólisis enzimática y fermentación simultánea de la macroalga *Macrocystis pyrifera?*

1.3. JUSTIFICACIÓN

El Perú es un país costero, con una amplia zona marina y una alta radiación solar que favorece el proceso fotosintético, por lo que tiene muchas ventajas y oportunidades para el desarrollo y producción de biocombustibles a partir de algas marinas.

En la Provincia de Ilo, el cultivo de la macroalga *Macrocystis pyrifera* ha sido desarrollado y promovido por el Gobierno Regional de Moquegua mediante el Proyecto: “Fortalecimiento de la pesquería del recurso macroalgas marinas en la provincia de Ilo, región Moquegua” y por el Laboratorio Costero de Ilo del INSTITUTO DEL MAR DEL PERU con la ejecución del proyecto: "Producción de semillas y cultivo en sistema suspendido de macroalgas de interés comercial en litoral marino de Ilo - Moquegua". Justificando la búsqueda de biocombustibles para la reducción de gases de efecto invernadero producidos por los combustibles fósiles.

En la región Moquegua, no se tiene conocimiento de la producción de Bioetanol, ni a nivel artesanal, tampoco a nivel industrial, a pesar de ser un departamento con litoral costero donde se podría sembrarse algas marinas,

creando una industria generadora de puestos de trabajo para la región Moquegua, tal como existe en el norte peruano. También esta siembra de algas podría usarse para la maricultura de otras especies.

Otra justificación importante de los biocombustibles como el bioetanol, generado a partir de algas marinas, es que a diferencia de otras materias primas agrícolas como la caña de azúcar y maíz, para su cultivo y producción no se usarían tierras agrícolas ni recursos hídricos, ni fertilizantes. Es decir la producción de etanol (EtOH) a partir de la *Macrocystis pyrifera* no comprometería tierras agrícolas que podrían usarse en la producción de alimentos para consumo humano.

1.4. OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Obtener bioetanol a partir de la macroalga *Macrocystis pyrifera*, mediante los procesos de hidrólisis y fermentación.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ✓ Evaluar dos concentraciones de 0% y 2% v/v de H_2SO_4 a dos temperaturas de 30°C y 120°C en la hidrólisis ácida de la macroalga *Macrocystis pyrifera*.

- ✓ Determinar los niveles de producción de bioetanol mediante los procesos de hidrólisis enzimática y fermentación separada en comparación con el proceso de hidrólisis enzimática y fermentación simultánea de la macroalga *Macrocystis pyrifera.*

1.5. HIPÓTESIS

HIPÓTESIS GENERAL

Aplicando los procesos de hidrólisis y fermentación, se obtiene bioetanol a partir de la macroalga *Macrocystis pyrifera*, debido al alto contenido de carbohidratos en su composición.

HIPÓTESIS ESPECÍFICAS

- Existen diferencias en la aplicación de dos concentraciones de 0% y 2% v/v de H_2SO_4 a dos temperaturas 30°C y 120°C para la hidrólisis ácida de la macroalga *Macrocystis pyrifera.*

- Existen diferencias en los niveles de producción de bioetanol mediante los procesos de hidrólisis enzimática y fermentación separada en comparación con el proceso de hidrólisis enzimática y fermentación simultánea de la macroalga *Macrocystis pyrifera.*

CAPÍTULO II

MARCO TEÓRICO

2.1. ANTECEDENTES DEL ESTUDIO

El uso de nuevas alternativas energéticas amigable con el medio ambiente. Actualmente a nivel mundial se viene desarrollando trabajos de investigación que contribuyen y aportan a minimizar la problemática energética, la producción de biocombustibles abre una oportunidad para aumentar la participación de las energías renovables no convencionales en la generación de energía.

Dávila (2016), evaluó la generación de bioetanol utilizando biomasa microalga cultivada en agua residual y cosechada por ozoflotación, se adaptó la microalga *Scenedesmus obliquus* para su crecimiento en agua residual, monitoreó el contenido de nutrientes (NH_3, NO_3, ortofosfatos) en el agua residual y carbohidratos totales en la biomasa durante las fases de crecimiento de las microalgas. Para el caso de los carbohidratos totales observó aumento de 14,41% a 31,07% debido a que la microalga entro en una fase de estrés al estar bajo deficiencia de nitrógeno amoniacal y bajo contenido de nitratos. Se

cuantificó el contenido de glucosa en la biomasa cosechada por ozoflotación y centrifugación por medio de una hidrólisis ácida y mediante un diseño experimental factorial de 3 factores. Además obtuvo bioetanol mediante la fermentación de los azúcares obtenidos a partir de la biomasa hidrolizada, obteniendo una concentración de etanol 1,8 g/L, con un rendimiento de 3,6% (g etanol/ g biomasa).

Leyton (2015), desarrolló un estudio que consistió, en dos etapas: en la primera se realizó fermentación aeróbica con reactivos puros en distintas razones de alginato-manitol, de modo de simular la composición de carbohidratos presentes en las macroalgas pardas. Con estos cultivos se calculó y evaluó la velocidad de crecimiento y los rendimientos de biomasa y de producto, con la finalidad de determinar condiciones óptimas para fermentar. En una segunda etapa, realizaron fermentación es micro-aeróbicas mediante un diseño experimental estadístico, para evaluar, principalmente, la producción de etanol. No se obtuvieron resultados favorables en esta condición, por lo que procedió a fermentar *M. pyrifera* en condiciones aeróbicas, con el objeto de verificar si los resultados con reactivos puros eran reproducibles al fermentar algas. Como resultado principal se obtuvo que la razón de alginato-manitol que reporta mejor rendimiento de etanol es 5:8 en condiciones aeróbicas.

Peteiro et al. (2015), indica que Algunas grandes algas marinas como las laminarias tienen un alto contenido de compuestos ricos en azúcares (polisacáridos). Estos polisacáridos pueden utilizarse para la producción de bioetanol mediante un proceso de fermentación con microorganismos que ha sido mejorado recientemente para su aplicación industrial. En este contexto, la acuicultura marina de laminarias puede constituir en un futuro próximo una fuente limpia y renovable de biomasa para la producción de etanol como biocarburante.

Carlos A. Guevara-Bravo1 (2015), Los polisacáridos del banano de rechazo verde (Variedad Cavendish AAA), de la zona de Urabá, fueron hidrolizados eficientemente, utilizando tratamiento endoenzimático a altas temperaturas. Posteriormente los azúcares simples fueron extraídos y los jugos resultantes fermentados con levaduras comerciales. Al final del proceso se determinó la concentración de etanol y se calcularon los rendimientos. Finalmente los jugos ricos en azúcares fueron fermentados con levaduras a 5 g/L, donde se alcanzó un rendimiento de 52 mL de etanol/Kg de banano. Estos resultados indican que el proceso es promisorio para producir alcohol a gran escala.

Hernández (2014), los procesos de obtención de acuerdo a la fuente de generación. Los resultados de la investigación indican que la mejor productividad industrial presentó la fuente de almidón; la desventaja que presenta es que se obtiene de productos destinados a la alimentación humana o animal, lo que compromete la seguridad alimentaria. Un aspecto importante a considerar es que existen grandes cantidades de residuos que van desde lo agrícola hasta lo industrial, los cuales son una fuente de materias primas para la producción de bioetanol; la desventaja que presenta esta fuente de generación, son los procesos que aún se siguen estudiando y mejorando. Otra fuente que resulta prometedora son las algas, las cuales no comprometen la seguridad alimentaria y no requieren de grandes extensiones de suelo cultivable; la desventaja es que, hasta el momento, los diversos métodos de obtención se encuentran en etapa experimental.

Molina (2013), planteó un estudio exploratorio de producción de bioetanol a partir de algas utilizando la levadura fermentadora de pentosas *Scheffersomyces stipitis*. Para ello primero determinó la cantidad de azúcares reductores totales, glucosa y xilosa de dos algas que crecen en las costas chilenas, *M. pyrifera y Ulva rigida,* eligiéndose esta última para continuar con el estudio, debido a que no requiere pretratamiento y contiene más xilosa. Luego se realizaron las estrategias de fermentación Sacarificación y

Fermentación Simultáneo (SSF) e Hidrólisis y Fermentación Separadas (SHF) utilizando *U. rigida y S. stipitis*, con el fin de comparar cuál estrategia entregaba mayores rendimientos. Pero en ambos casos fueron mayores que SSF y SHF utilizando sólo *S. stipitis.*

Briones (2012), con el objetivo de producir etanol a partir del alga *Ulva rígida*, diseñó un procedimiento experimental que consistió en un pretratamiento con ácido diluido (1% y 2% v/v de ácido sulfúrico) a diferentes temperaturas (30°C y 120°C). La fracción sólida resultante del pretratamiento fue sometida a una hidrólisis enzimática, gracias a la acción de celulasas y celobiasas. 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 de las dos estrategias de fermentación SSF y SHF fueron diferentes.

Harris Correa (2012), El creciente consumo de energía a nivel mundial y la escasez de combustibles fósiles han dado espacio a nuevas fuentes de energía de carácter renovable y con un impacto ambiental menor. Entre estas fuentes de energía aparece el material lignocelulósico, que puede ser utilizado para producir bioetanol de segunda generación, el cual es un sustituyente o complemento de la gasolina utilizada para el transporte terrestre. La

producción de bioetanol a partir de material lignocelulósico consta principalmente de tres etapas: pretratamiento, hidrólisis enzimática y fermentación. En el presente trabajo se realizó una comparación entre tres pretratamiento: explosión a vapor, organosolv y líquidos iónicos (utilizándose emimCl en este caso) y dos residuos de distintos tamaños: eucalipto: 1,2 mm; álamo: 1,30 mm. Estas técnicas se compararon por medio de una caracterización física y química, con lo que se estableció el principal efecto que tienen sobre el material y la propiedad más relevante para comprender la conversión de glucosa obtenida en la hidrólisis enzimática.

Donaji JIMÉNEZ ISLAS1 (2011), Con el propósito de incrementar la cantidad de azúcares que beneficie el rendimiento de etanol en la fermentación, se realizó la hidrólisis de *Beta vulgaris* L. con H_2SO_4. Se evaluó el efecto que tienen los parámetros: agitación, concentración de ácido, masa y temperatura sobre el grado de hidrólisis del sustrato. La masa se probó en el intervalo de 5 hasta 40 g y la agitación de 100 a 250 rpm. La temperatura y el tiempo de reacción fueron evaluados en el intervalo de 30 a 90ºC y de 2 a 6 h, respectivamente. El incremento en el tiempo de reacción indicó que se lleva a cabo la degradación de hemicelulosa dentro de la matriz del sustrato y se generan regiones amorfas que promueven la disponibilidad de la celulosa.

Lesly Tejeda 1 (2011), En esta investigación, se pretendió estudiar el aprovechamiento de los residuos de poda y la búsqueda de materias primas para producir biocombustibles. Se llevó a cabo la hidrólisis de la biomasa lignocelulósica contenida en los residuos de poda, de la Fundación Universitaria Tecnológico Comfenalco, con el fin de producir jarabes glucosados para, potencialmente, ser convertidos en bioetanol. Se aplicaron dos metodologías: la hidrólisis ácida, usando ácido sulfúrico diluido y la hidrólisis enzimática, con enzimas celulasas. A manera de resultados, se obtuvo una mayor conversión con la hidrólisis ácida de todas las muestras (entre 10 y 30g/L de glucosa) que con la hidrólisis enzimática de los residuos mezclados (8,83g/L de glucosa), quedando abierta la posibilidad de obtener biocombustibles a partir de este tipo de residuos. Se hace necesaria la optimización de los procesos con el propósito de mejorar el rendimiento en la producción de glucosa.

Niklitschek (2010), El presente trabajo estudia la estrategia Sacarificación y Fermentación Simultáneas (SSF) como la principal tecnología de fermentación que permite aumentar la producción de bioetanol a partir de residuos forestales, específicamente de la especie *Nothofagus pumilio* también conocida lenga. El factor que mostró tener un efecto más significativo en el rendimiento de etanol correspondió al tipo de

pretratamiento utilizado: ácido sulfúrico diluido (ASD 0,75%) versus el líquido iónico (LI) 1-etil-3-metiImidiazol cloro ([EMIM] Cl).

Los resultados obtenidos mostraron que la mayor concentración de etanol, 10,4 g/l, fue alcanzada usando una fracción sólida al 9% p/v del material pretratado con el líquido iónico [EMIM] Cl. Se utilizó la levadura *S. cerevisiae* cepa Red Star como microorganismo fermentador.

2.2. BASES TEÓRICAS

2.2.1. MACROALGA *Macrocystis pyrifera*

Las macroalgas se pueden dividir en tres grupos: las algas pardas (*Phaeophyta),* las algas verdes (*Chlorophyta*) y las algas rojas (*Rhodophyta*), (Vásquez y Fonk, 1994).

Macrocystis pyrifera, es una macroalga parda, que se distribuye en las costas de Pacifico Norte (Alaska, norte de Baja California y México) y en las costas del Pacifico de América del Sur (desde Perú hasta Cabo de hornos en Chile) (Alveal, 1995).

Macrocystis pyrifera es la macroalga más distribuida a nivel mundial, forman grandes bosques marinos en el hemisferio Norte y el Sur (Mann, 1973).

Los bosques marinos que forma *Macrocystis,* para una gran diversidad de especies de invertebrados y peces constituyen refugio, hábitat y fuente de alimento (Plana et al., 2007).

Las macroalgas son diferentes y a la vez análogos a las plantas superiores, *Macrocystis pyrifera* en su morfología presenta un rizoide que tiene la función de fijar al sustrato el alga en forma disco que puede medir hasta 40 cm de diámetro y 35 cm de altura, posee neumatocistos o aerocistos que le dan flotabilidad al alga que son vesículas con aire, poseen cauloides cilíndricos y flexibles con ramificaciones dicotómicas en forma de tallos y muchos frondas o filoides aplanadas parecidas a las hojas. Un alga adulta puede medir hasta 40 m o más y poseen frondas en estados de madures (juveniles, adultas y senescentes) (Hauenstein y González, 1994).

Las macroalgas son importantes en el ambiente marino no solo por su productividad primaria, sino además por que filtran del agua de mar grandes cantidades N (nitrógeno), P (fosforo), la biomasa generada de algunas especies es empleado por las industria en beneficio del ser humano, por lo que son de interés económico (Salavarría, 2014).

Las especies de macroalgas de importancia comercial del Perú, pertenecen al grupo de las *Chlorophyta*, distribuidas desde Lambayeque hasta Ica, destacando la *Ulva sp;* los que pertenecen al grupo de las *Rhodophyta*, distribuida desde Lambayeque hasta la parte central de Ica, destacando principalmente *Gracilaria sp., Graciolariopsis sp., Chondracanthus sp. Y Porphyra sp.;* en el grupo de las *Phaeophyta* (Macroalgas pardas) existen tres especies de importancia *Lessonia nigrescens, Lessonia trabeculata y Macrocystis pyrifera* (IMARPE, 2012).

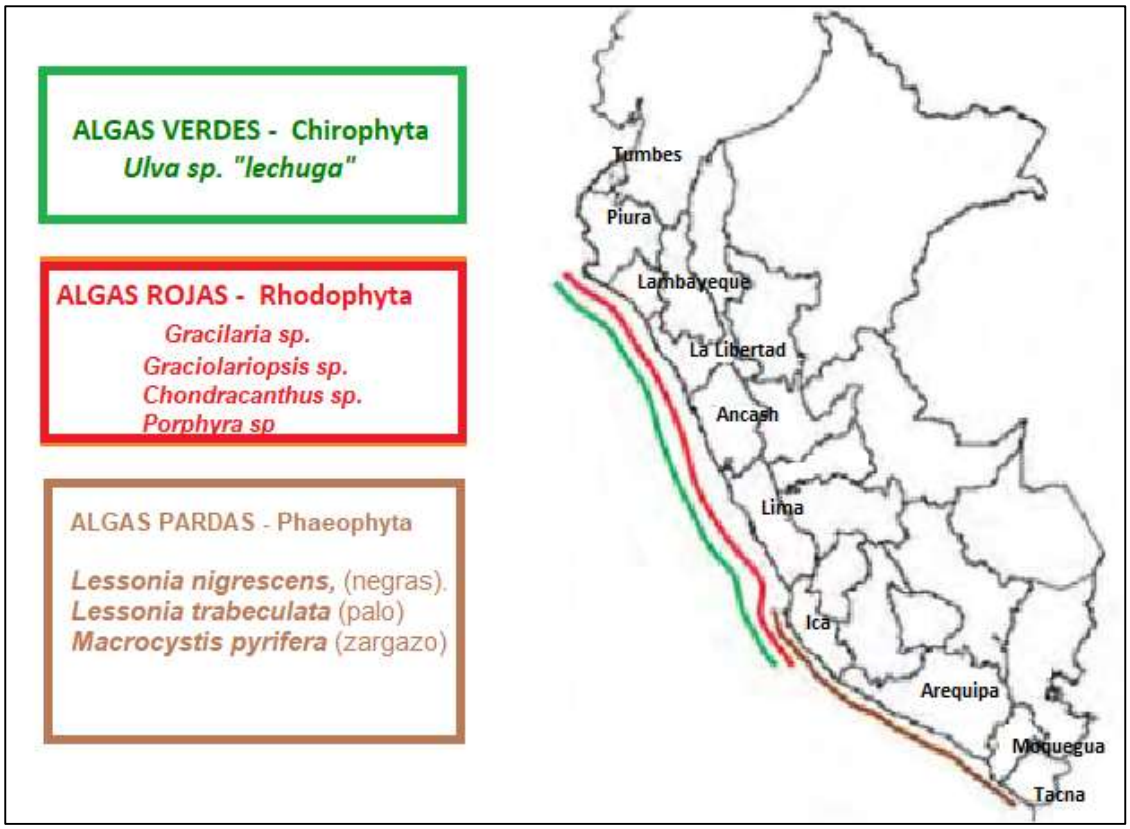


Figura 1: *Macroalgas de Importancia Comercial del Perú.*

Las macroalgas verdes se encuentran distribuidas desde el norte peruano hasta Ica, destacando *Ulva sp;* las macroalgas rojas se encuentran distribuidas desde Lambayeque hasta la parte central de Ica, destacando *Gracilaria sp*; las macroalgas pardas se encuentran distribuidas en el sur peruano desde Ica hasta Tacna, destacando sus tres especies.

Fuente: IMARPE, 2012

CLASIFICACIÓN TAXONÓMICA de *Macrocystis pyrifera*

Taxonómicamente la Macrocystis pyrifera (Linnaeus) C. AGARDH 1820:

División: Heterokontophyta

Clase: Phaeophyceae

Orden: Laminariales

Familia: Laminariaceae

Género: Macrocystis

Especie: Macrocystis pyrifera

Nombre vulgar: Sargazo o boyador



Figura 2: *Macrocystis pyrifera*
Fuente: fotografía propia, 2019.

2.2.1.1. COMPOSICIÓN DE *Macrocystis pyrifera*

La composición química de las algas varía de acuerdo a su ubicación geográfica, estación, exposición las corrientes y al oleaje, disponibilidad de nutrientes en el medio, temperatura, profundidad, estado de desarrollo de las algas (Cruz-Suárez et al., 2000).

Los carbohidratos son los componentes predominantes en la macroalga *M. pyrifera*, y se encuentran en forma de gomas (ácido algínico) principalmente (Castro-Gonzales et al., 1994).

En las algas pardas los alginatos están presentes en la pared celular y están compuestos por dos tipos de monómeros: el ácido β-D-manuronico (M) y el ácido α – L galuronico, estos forman polímeros de cadena lineal. Estos monómeros pueden formar bloques de secuencias MM y MG que están unidos por enlaces glucosídicos β (1-4) y bloques GG y GM unidos por enlaces glucosidicos α (1-4). La disposición de estos bloques le otorga al polímero propiedades de hidrocoloide y reactividad en cuanto al calcio y permite su uso en la industria alimentaria, textil, farmacéutica y otros como gelificante y espesante (Peso-Echarry et al., 2012).

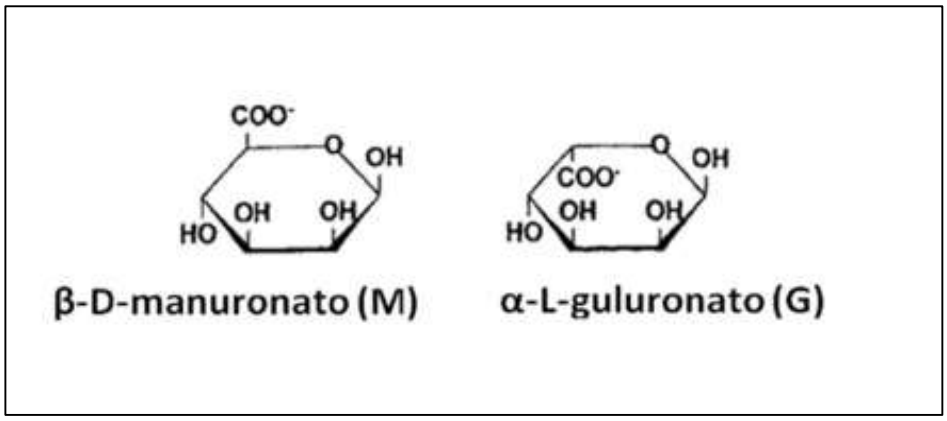


***Figura* 3:** *Dos tipos de monómeros presentes en la Pared Celular.*
Fuente: Peso-Echarry et al., 2012.

La composición proximal *M. pyrifera,* colectada en dos estaciones de año se muestra en la **Tabla 1**, de las muestras de Baja California Sur y Bahía de Tortugas. Muestran que las cenizas y los carbohidratos fueron los componentes predominantes en ambas épocas de recolección, sin embargo. En general, las algas pardas presentan un bajo contenido de nitrógeno. Los carbohidratos se encuentran principalmente en forma de gomas (ácido algínico), que son ampliamente empleadas en la industria alimentaria (Round, 1981).

Tabla 1:
Análisis químico proximal de la macroalga M. pyrifera, colectada en dos estaciones.

Composición (g/100g de alga seca)	Verano	Invierno	Promedio
Proteína bruta (N x 6,25)	8,76	10,7	9,73
Carbohidratos	46,27	50,6	48,435
Fibra bruta	7,74	4,45	6,095
Cenizas	36,67	33,53	35,1
E. Etéreo	0,56	0,75	0,655

Fuente: Castro-Gonzales et al., 1994.

2.2.1.2. CULTIVO DE MACROALGAS PARA BIOCOMBUSTIBLES

Para el éxito de la producción de bioetanol a partir de algas laminarias es necesario un suministro sostenible de biomasa que permita su aplicación industrial como fuente de biocarburantes. Aunque los recursos naturales de las laminarias son limitados, particularmente en la costa atlántica española, su cultivo a gran escala es viable mediante técnicas sencillas y de bajo coste. La acuicultura marina de macroalgas es importante en Japón, China y Corea del Sur donde, por ejemplo, especies de laminarias conocidas con el nombre

comercial de “kombu” se cultivan comercialmente. Actualmente, la agronomía marina de laminarias en Asia produce unos 8 millones de toneladas al año, mientras que en Europa y América se está empezado a cultivar de manera experimental o en pequeña escala (Peteiro et al., 2015).

2.2.1.3. PESQUERÍA DE MACROALGAS EN EL PERÚ.

En la zona sur del litoral peruano, se recolectan regularmente las especies macroalgas como la *M. pyrifera* (“sargazo”), *Lessonia nigrescens* (“aracanto negro”) y *Lessonia trabeculata* (“aracanto”) los cuales forman bosques marinos y cinturones densos en el ambiente inter y submareal (IMARPE, 2018).

Sin embargo, estas macroalgas en el Perú, solo son extraídas, secadas y trituradas y exportadas principalmente a China; Las macroalgas tienen mayor cantidad de usos para beneficios del ser humano. La versatilidad de las macroalgas ha permitido que sea utilizada en diversos campos como el farmacológico, el ambiental y la industria alimentaria.



Figura 4: *Acopio de Macroalgas Varadas.*
Fuente: IMARPE, 2012.

2.2.2. FERMENTACIÓN

El proceso de la fermentación alcohólica es una bioreacción que permite degradar azúcares y obtener como productos alcohol y dióxido de carbono (CO_2), las levaduras son las principales responsables de la fermentación, *Saccharomyces cerevisiae* es la más usada (Vázquez y Dacosta, 2007).

La conversión se expresa mediante la ecuación:

$$C_6H_{12}O_6 => \quad 2C_2H_5OH + 2CO_2 + \varepsilon$$

En donde **$C_6H_{12}O_6$** corresponde a una molécula de glucosa, como el principal azúcar fermentable existente; **C_2H_5OH** a una molécula de etanol (EtOH), **CO_2** una molécula de dióxido de carbono y **ε** a la energía liberada en la reacción.

El rendimiento teórico cuantificado por Gay Lussac es que por 1g de glucosa se transforma 0,511 g de etanol (EtOH) y 0,489 g CO_2, este rendimiento es difícil de lograr, debido a que la levadura utiliza la glucosa para producción de otros metabolitos. Experimentalmente se determinaron rendimiento entre el 90% y 95% del teórico (Vázquez y Dacosta, 2007).

El rendimiento teórico estequiométrico para la transformación de glucosa en etanol es de 0,511 g de etanol (EtOH) y 0,489 g de CO_2 por 1 g de glucosa. Este valor fue cuantificado por Gay Lussac. En la realidad es difícil lograr este rendimiento, porque como se señaló anteriormente, la levadura utiliza la glucosa para la producción de otros metabolitos. El rendimiento experimental varía entre 90% y 95% del teórico, es decir, de 0,469 a 0,485 g/g. Los rendimientos en la industria varían entre 87 y 93% del rendimiento teórico (Boudarel, 1984). Otro parámetro importante es la productividad (g/h/l), la cual se define como la cantidad de etanol (EtOH) producido por unidad de tiempo y de volumen.

2.2.3. HIDRÓLISIS ÁCIDA

La hidrólisis ácida es el proceso más usado en el pre tratamiento, en el cual se trata con ácido sulfúrico (H_2SO_4) la biomasa a una concentración y temperatura determinada. Este proceso desorganiza la estructura cristalina de la pared celular y de esta manera se puedan liberar los polímeros de la celulosa. Esta técnica de pretratamiento es aplicable a toda biomasa que posee una capa de lignina que se encarga de recubrir a estructura cristalina de hemicelulosa y celulosa (Taherzadeh y Karimi, 2007).

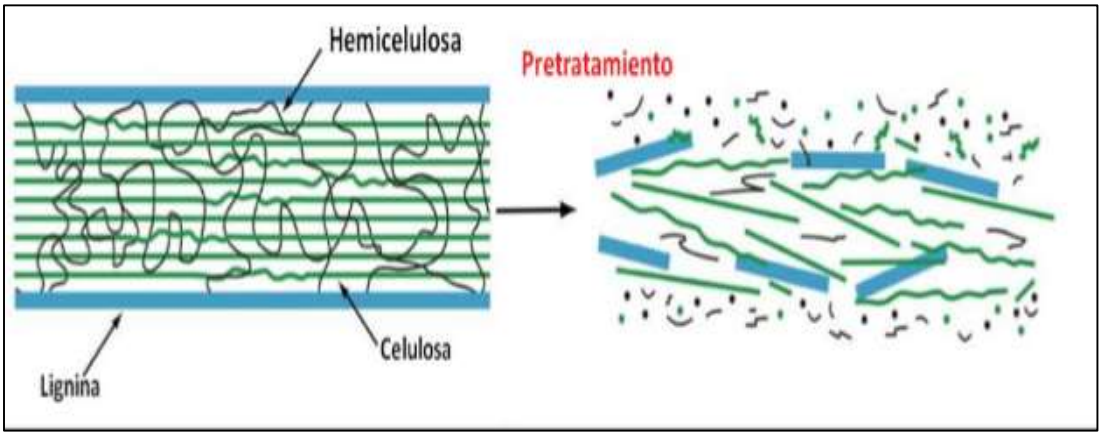


Figura 5: *Esquema del cambio estructural del material lignocelulósico debido a la etapa de pretratamiento.*
Fuente: Tomás Andrés Niklitschek, 2010.

2.2.4. HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA

El proceso de la hidrólisis enzimática consiste en la liberación de los azúcares que constituyen a los polímeros de la biomasa y se da gracias a la acción de las enzimas que trabajan con pH de 4,0 a 4,5 y temperaturas de 40°C a 50°C, la concentración, actividad de la celulasa, la calidad del sustrato, agitación, pH y temperatura son los factores principales que afectan el proceso de la hidrólisis enzimática (Taherzadeh y Karimi, 2007).

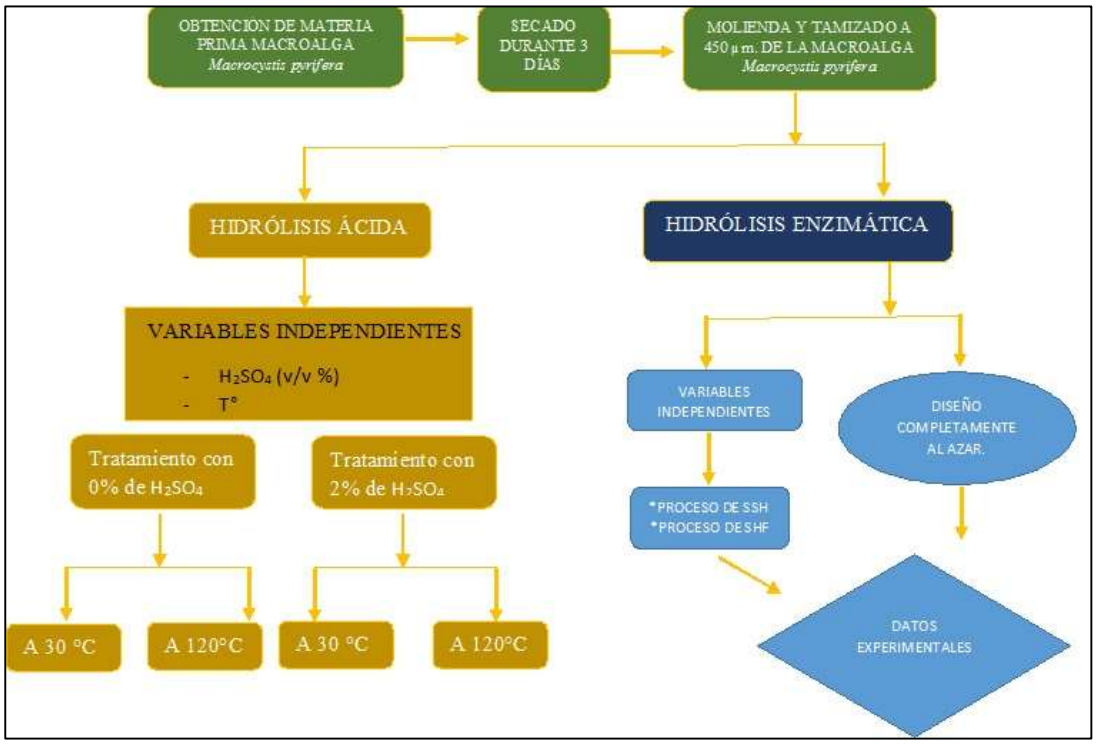


Figura 6: *Esquema de los procesos realizados para la obtención de bioetanol a partir de la macroalga M. pyrifera.*
Fuente: elaboración propia, 2019.

En la **Figura 6** se muestra el flujo grama seguido para la realización de los procesos de hidrólisis ácida e hidrólisis enzimática. Desde la obtención de la materia prima de la macroalga *M. pyrifera*. Pasando por un secado, para luego pasar a molienda y al método mecánico de tamizado a 450µm. teniendo la muestra lista para realizar los procesos y habiendo identificando sus variables independientes, para continuar con método experimental del proceso de hidrólisis ácida a dos concentraciones de ácido sulfúrico como así mismo a dos temperaturas. Y posteriormente iniciar con el proceso de hidrólisis enzimática, este procedimiento se divide en dos métodos el de hidrólisis enzimática y fermentación separada (SHF) e hidrólisis enzimática y fermentación simultánea (SSF); donde se emplea la aplicación de enzima y levadura para que acelere la reacción enzimática y se pueda desarrollar el proceso de fermentación.

2.3. DEFINICIÓN DE TÉRMINOS

a) **Biocombustibles:** Productos químicos que se obtienen a partir de materias primas de origen agropecuario, agroindustrial o de otra forma de biomasa y que cumplen con las normas de calidad establecidas por las autoridades competentes para su uso como combustible. Éstos pueden ser sólidos (biomasa), gaseosos (biogás, gas de gasificador u otros tipos de gas manufacturados a partir de residuos, carbón, etc.) o líquidos (Decreto Supremo Nº 021-2007-EM).

b) **Etanol:** Es el alcohol etílico cuya fórmula química es CH_3-CH_2-OH y se caracteriza por ser un compuesto líquido, incoloro, volátil, inflamable y soluble en agua (Decreto Supremo Nº 021-2007-EM).

c) **Gasohol:** Es la mezcla que contiene gasolina (de 97, 95, 90, 84 octanos) y alcohol carburante (Decreto Supremo Nº 021-2007-EM).

d) **Alcohol carburante:** Es el etanol anhidro desnaturalizado (Decreto Supremo Nº 021-2007-EM).

e) Bioetanol: etanol cuya fórmula química es CH_3-CH_2-OH, es un producto químico que es obtenido por la fermentación de los azúcares presentes en los productos vegetales como: caña de azúcar, cereales, sorgo, remolacha, otro tipo de biomasa.

CAPÍTULO III

MARCO METODOLÓGICO

3.1. TIPO Y DISEÑO

La presente investigación según su finalidad es aplicada, por que explora la posibilidad de obtener bioetanol a partir de la macroalga *M. pyrifera*. Según el método de manipulación de datos es cuantitativa, con un diseño experimental completamente al azar. (Según Hernández 2003).

3.1.1 TIPO DE INVESTIGACIÓN

En cuanto a la línea de investigación de la Escuela Profesional de Ingeniería Ambiental corresponde a la línea de Desarrollo Sustentable, debido a que genera conocimiento basado en el método científico para la obtención de bioetanol a partir de *M. pyrifera*, que es una alga parda que puede ser producida mediante la maricultura en las cantidades requeridas en la Provincia de Ilo y el País.

3.1.2 DISEÑO DE INVESTIGACIÓN

El diseño completamente al azar (DCA), se usa generalmente en los experimentos en laboratorio, cuando las unidades experimentales son homogéneas o la variación entre ellas es muy pequeña; en donde los tratamientos se aplican aleatoriamente sobre las unidades experimentales (Segura, 2000).

En el DCA, la hipótesis nula, es donde los efectos de los tratamientos (T), son todos iguales:

$$H_0 = T_1 = T_{2\ldots}$$

La hipótesis alterna, es que hay al menos un efecto de tratamiento que es diferente a los demás. Para probar la hipótesis, en la tabla **ANOVA** se comparan los cuadrados medios de tratamientos respecto a los cuadrados medios del error, los primeros deben ser suficientemente mayores que los segundos.

En este estudio se consideró el Diseño Completamente al Azar (DCA), en el cual se definen los tratamientos “t” que se van a aplicar a las “n”

unidades experimentales, con sus respectivas replicas “r” por tratamiento sobre las unidades experimentales.

3.2. NIVEL DE INVESTIGACIÓN

El nivel de investigación es experimental, Puesto que se manipuló las variables independientes, como son concentración de ácido sulfúrico, temperatura, concentración de enzima celulasa, concentración de la levadura *Saccharomyces cerevisiae.*

3.3. OPERACIONALIZACIÓN DE VARIABLES

En la **tabla 2** se describe las variables tanto independientes como dependientes para cada proceso que se realizó en este trabajo de investigación, seguidamente se detalla su operacionalización.

3.3.1. Operacionalización de las variables independientes.

- **Ácido sulfúrico**: factor que se ha determinado, para acelerar este procedimiento experimental.
  - **Indicador**: concentración de 0% y 2 % (v/v) de H_2SO_4

- **Temperatura:** factor que contribuye a la degradación de la pared celular.
  - **Indicador:** proceso de pretratamiento a temperaturas 30°C y 120°C.
- **Hidrólisis enzimática y fermentación separada:** tratamiento que consiste en la liberación de los azucares.
  - **Indicador:** la dosis, 1 ml de enzima celulasa, manteniéndose a una temperatura de 45°C y por un tiempo de 12 horas, posteriormente se inocula 1 g de levadura *Saccharomyces cervisiae*.
- **Hidrólisis enzimática y fermentación simultánea:** tratamiento que consiste en la liberación de los azucares.
  - **Indicador:** la dosis, 1 ml de enzima celulasa y 1 g de levadura *Saccharomyces cervisiae*.

3.3.2. Variable Dependiente.

Liberación de azúcares reductores.

Concentración de bioetanol.

Tabla 2:

Descripción de Variables.

PROCESO	VARIABLES INDEPENDIENTES	VARIABLES DEPENDIENTES
Hidrólisis ácida de *M. pyrifera.*	- Ácido sulfúrico (v/v %) - Temperatura (°C)	- Liberación de azúcares reductores (g)
Hidrólisis enzimática de *M. pyrifera.*	- **Tratamiento 1:** Hidrólisis enzimática y fermentación separada. enzima (ml) levadura (g) - **Tratamiento 2:** Hidrólisis enzimática y fermentación simultánea. enzima (ml) levadura (g)	- concentración de bioetanol (ml/g)

Fuente: elaboración propia – 2019.

3.4. POBLACIÓN Y MUESTRA

3.4.1. POBLACIÓN

La población está constituida por el banco natural de macroalga *M. pyrifera* de la zona marina de gentilares, Provincia de Ilo, Departamento de Moquegua.



Figura 7: *Ubicación de la zona de colecta de la macroalga M. pyrifera, en la provincia de Ilo.*
Fuente: Google Earth (2019).

3.4.2. MUESTRA

La muestra es no probabilística y está constituida 1 kg de biomasa seca de *M. pyrifera*, que es la cantidad suficiente estimada para realizar todas las pruebas en la presente investigación, es importante recalcar que las macroalgas pardas están en veda de acuerdo a la Resolución Ministerial N°839-2008-PRODUCE, por lo que no se puede extraer, no obstante, la muestra ha sido colectada con apoyo de un pescador artesanal alguero con permiso de pesca.

3.5. TÉCNICAS E INSTRUMENTOS PARA LA RECOLECCIÓN DE DATOS

3.5.1. TÉCNICAS

Para la recolección de datos del trabajo de investigación se usó una técnica de muestreo no probabilística conocido como Muestreo por Conveniencia. Se usó esta técnica por ser de bajo costo y contar con disponibilidad para conseguir la materia prima en la zona marina de gentilares, Provincia de Ilo.

3.5.1.1. LUGAR DE ESTUDIO

El trabajo de investigación se realizó en los laboratorios de la Universidad Nacional de Moquegua sede Moquegua y Filial Ilo.

3.5.1.2. MATERIA PRIMA

La materia prima utilizada en este estudio corresponde a la macroalga parda *M. pyrifera* **(Figura 8),** que fue colectada en el litoral de la provincia de Ilo, específicamente en la zona de gentilares, con apoyo de pescador artesanal alguero con permiso de pesca vigente.



Figura 8: *Fotografía de la macroalga M. pyrifera. Tiene las siguientes dimensiones 1.25cm de largo y 30cm de ancho.*
Fuente: propia, 2019.

Fue sometido al proceso de secado durante 3 días, durante la estación de verano del 2019, mediante exposición al sol, hasta que el alga alcanzara un peso contante.

Luego se sometió al proceso de la molienda y se utilizó el método mecánico de tamizado, el cual consiste en pasar una mezcla de partículas de diferentes tamaños por un tamiz de 450 µm.

3.5.1.3. ENZIMAS

La enzima que se empleó para el proceso de hidrólisis enzimática fue la celulasa de la marca ROHAMENT® CL, el cual es un preparado enzimático para degradar la celulosa, que se obtiene a partir de *Trichoderma reesei*, según la ficha técnica de la enzima ver **Anexo 1.**

3.5.1.4.MICROORGANISMO FERMENTADOR

En este trabajo de investigación se utilizó la levadura *Saccharomyces cerevisiae*, el cual es una levadura seca comercial usado para la industria panificadora.

3.5.1.5.HIDRÓLISIS ÁCIDA

El proceso de la hidrólisis ácida de la macroalga *M. pyrifera* se realizó de acuerdo a lo descrito por Briones (2012), que consiste en el tratamiento con ácido sulfúrico (H_2SO_4) a dos concentraciones [0%] y [2%] v/v y sometido a dos diferentes temperaturas 30°C y 120°C, según el diagrama del flujo que se muestra en la **Figura 8** y la **Tabla 3.**

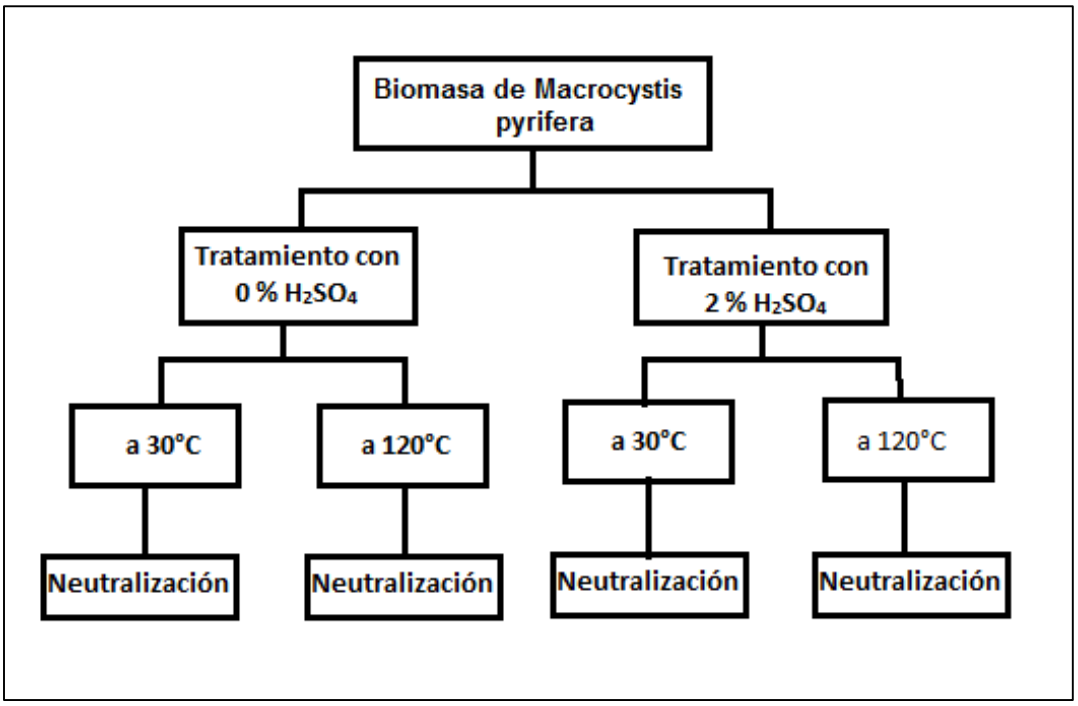


Figura 9: *Diagrama de flujo de hidrólisis ácida.*
Fuente: elaboración propia -2019.

Para realizar la hidrólisis ácida **(Figura 9),** se agregó en tubos falcón de 50 ml, 1 g de biomasa seca de *M. pyrifera* y 20 ml de ácido sulfúrico (H_2SO_4) a concentraciones de [0%] y [2%] a razón 1:20 (en p/v, es decir 1g y 20 ml) y se tapa los tubos falcón, luego se procedió a someter a dos temperaturas 30°C y 120°C, cada tratamiento se realizó por triplicado. El tratamiento de 30°C de temperatura se realizó en una incubadora y el de 120°C en una estufa. El tiempo del tratamiento a las dos temperaturas fue de 30 minutos, luego se enfriaron los tubos falcón con las muestran en un baño con hielo a 0°C.

Una vez que las muestran alcanzaron la temperatura ambiente, se neutralizaron con hidróxido de sodio (NaOH), hasta alcanzar un pH 8 a 11, y se procedió a medir los azúcares reductores con el reactivo de Fehling, para determinar la efectividad de la hidrólisis ácida.

Finalmente se determinó, que no hubo liberación de azúcares reductores con el proceso de hidrólisis ácida**.**

Tabla 3
Hidrólisis ácida de M. pyrifera

% de concentración de ácido sulfúrico a dos temperaturas	Replicas
0 % H_2SO_4 a 30°C	3
0% H_2SO_4 a120°C	3
2% H_2SO_4 a 30°C	3
2% H_2SO_4 a 120°C	3

Fuente: elaboración propia – 2019.

3.5.1.6.PRODUCCION DE BIOETANOL POR HIDRÓLISIS Y FERMENTACIÓN SIMULTÁNEA

Se procedió a pesar 25 g de biomasa seca de *M. pyrifera*, la muestra se llevó a botellas PET de 1l y se enrasó hasta 500 ml con agua destilada, al cual se incorporó 1 ml de enzima celulasa ROHAMENT® CL, para que ocurra el proceso de la hidrólisis de los carbohidratos presentes en la macroalga, posteriormente se ajustó pH 4,5 con ácido ascórbico ($C_6H_8O_6$) para que acelere la reacción enzimática y los carbohidratos de la macroalga se pueda hidrolizar en azúcares reductores, posteriormente se inocula 1 g de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* para que se pueda desarrollar el proceso de la fermentación, la muestra se mantuvo a 35°C, en una incubadora por un periodo de 72 horas, finalmente para determinar la cantidad de bioetanol producido mediante el proceso de hidrólisis enzimática y fermentación simultánea, las muestras se analizaron en el Laboratorio de Investigación y Servicios de la Universidad Nacional de San Agustín de Arequipa.

3.5.1.7.PRODUCCION DE BIOETANOL POR HIDRÓLISIS Y FERMENTACIÓN SEPARADA

Se procedió a pesar 25 g de biomasa seca de *M. pyrifera*, la muestra se llevó a botellas PET de 1l y se enrasó hasta 500 ml con agua destilada, al cual se incorporó 1 ml de enzima, para que ocurra el proceso de la hidrólisis de los carbohidratos presentes en la macroalga, posteriormente se ajustó pH 4,5 con ácido ascórbico para que la velocidad de la reacción enzimática sea más rápida y los carbohidratos de la macroalga se pueda hidrolizar en azúcares reductores, la muestra se mantuvo a una temperatura de 45°C durante 12 horas.

Posteriormente se inoculó 1 g de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* para que se pueda desarrollar el proceso de la fermentación, la muestra se mantuvo a 35°C, en una incubadora celulasa ROHAMENT® CL por un periodo de 72 horas, finalmente para determinar la cantidad de bioetanol producido mediante el proceso de hidrólisis enzimática y fermentación separada, las muestras se analizaron en el Laboratorio de Investigación y Servicios de la Universidad Nacional de San Agustín de Arequipa.

3.6. MÉTODOS Y TÉCNICAS PARA LA PRESENTACIÓN Y ANÁLISIS DE DATOS.

Para evaluar si existen diferencias significativas entre los tratamientos se usó el diseño completamente al azar (DCA), que es uno de los más usados en el diseño de experimentos, esta prueba basada en el análisis de varianza, en el cual la variabilidad total se descompone en la "variabilidad de los tratamientos" y la "variabilidad del error". La finalidad es determinar si existe una diferencia significativa entre dos o más tratamientos, para lo cual se compara si la "variabilidad del tratamiento" con respecto a la "variabilidad del error" y se determina si la primera es lo suficientemente alta según la distribución F.

CAPÍTULO IV

RESULTADOS

4.1. EVALUACIÓN DE DOS CONCENTRACIONES DE ÁCIDO Y DOS TEMPERATURAS PARA LA HIDRÓLISIS ÁCIDA DE LA MACROALGA *M. pyrifera*.

En cuanto al pretratamiento aplicado a las biomasa de la alga parda *M. pyrifera*, se trabajó con dos concentraciones de ácido sulfúrico (H_2SO_4) es decir [0%] y [2%] a dos temperatura 30°C y 120°C, en ningún caso se registró liberación de azúcares reductores producto de hidrólisis ácida de la alga parda, los resultados de la hidrólisis ácida se muestran en la **tabla 4**, lo que indica que el tratamiento de la muestra de la alga parda con las concentraciones de ácido sulfúrico y temperatura no producen liberación de azúcares reductores por hidrólisis ácida, esto se evidencio cuando se trató con reactivo de Fehling a la fracción liquida de la muestra. **Anexo 2.**

Tabla 4:

Resultados de hidrólisis ácida de M. pyrifera.

% de concentración de ácido sulfúrico y dos temperaturas	Replicas	Liberación de azúcares reductores (%)
0 % H_2SO_4 a 30°C	3	0
0% H_2SO_4 a 120°C	3	0
2% H_2SO_4 a 30°C	3	0
2% H_2SO_4 a 120°C	3	0

Fuente: elaboración propia – 2019.

Análisis e interpretación

Según la **tabla 4** con respecto a los resultados de liberación de azúcares reductores, en ambas concentraciones de ácido sulfúrico y expuesto a dos temperaturas, se concluye que no hubo presencia de azúcares en todas las réplicas realizadas.

4.2. DETERMINACIÓN DE LOS NIVELES DE PRODUCCION DE BIOETANOL MEDIANTE LOS PROCESOS DE HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA Y FERMENTACIÓN SEPARADA DE LA MACROALGA *M. pyrifera.*

En este caso primero se procedió a realizar la hidrólisis enzimática de la macroalga por 12 horas, posteriormente las muestras fueron sometidos al proceso de fermentación con la levadura *Saccharomyces cerevisiae* durante 72 horas, los resultados de la determinación de la cantidad de bioetanol producido a partir de la macroalga *M. pyrifera* se muestran en el **Anexo 3** el cual está tabulado en la **tabla 5**.

Tabla 5

Producción de bioetanol en el proceso de hidrólisis y fermentación separada.

M. pyrifera en proceso de hidrólisis y fermentación separada	Replicas	Grado alcohólico a 20°C	Producción de bioetanol en ml	ml bioetanol/ g macroalga
25 g macroalga	M – 4	1.30	6.5	0.26
25 g macroalga	M – 5	1.59	7.95	0.32
25g macroalga	M – 6	2.56	12.8	0.51
Promedio		1.82	9.08	0.36

Fuente: elaboración propia – 2019.

Según la **tabla 5** con respecto a los resultados de la obtención de bioetanol, mediante el proceso de hidrólisis y fermentación separada, donde se realizó tres réplicas (M4, M5, M6), cada una de ellas de 25 g de muestra *M. pyrifera* en una solución de 500 ml de agua destilada, enviadas a analizar al laboratorio de la Universidad Nacional San Agustín de Arequipa, dando los resultados en % de grados alcohólico a 20°C.

Haciendo una regla de tres obtenemos la Producción de bioetanol en ml. luego se divide entre los 25 g de materia prima para obtener los ml de bioetanol/ g macroalga.

La mayor obtención de bioetanol fue de 0.51 ml de bioetanol/ g de macroalga en la réplica M- 6. El promedio de las tres réplicas fue 0.36 ml de bioetanol/ g de macroalga.

4.3. DETERMINACIÓN DE LOS NIVELES DE PRODUCCION DE BIOETANOL MEDIANTE EL PROCESO DE HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA Y FERMENTACIÓN SIMULTÁNEA DE LA MACROALGA *M. pyrifera.*

Se procedió a realizar la hidrólisis enzimática de la macroalga y fermentación con la levadura *Saccharomyces cerevisiae* de manera simultánea durante 72 horas, los resultados de la producción de bioetanol a partir de la macroalga *M. pyrifera*, se muestran en el **Anexo 3** el cual está tabulado se muestran en la **tabla 6**.

Tabla 6:
Producción de bioetanol en el proceso hidrólisis enzimática y fermentación simultánea.

M. pyrifera en proceso en proceso de hidrólisis y fermentación simultánea	Réplicas	Grado alcohólico a 20°C	Producción de bioetanol en ml	ml bioetanol/ g macroalga
25 g macroalga	M1	2.05	10.25	0.41
25 g	M2	2.54	12.7	0.51
25 g	M3	2.32	11.6	0.46
	Promedio	2.30	11.52	0.46

Fuente: elaboración propia – 2019.

Según la **tabla 6** con respecto a los resultados de la obtención de bioetanol, mediante el proceso de hidrólisis y fermentación simultánea, donde se realizó tres réplicas (M1, M2, M3), cada una de ellas de 25 g de muestra *M. pyrifera* en una solución de 500 ml de agua destilada, enviadas a analizar al laboratorio de la Universidad Nacional San Agustín de Arequipa, dando los resultados en % de grados alcohólico a 20°C.

Haciendo una regla de tres obtenemos la Producción de bioetanol en ml. luego se divide entre los 25 g de materia prima para obtener los ml de bioetanol/ g macroalga.

La mayor obtención de bioetanol fue de 0.51 ml de bioetanol/ g de macroalga en la réplica M- 2. El promedio de las tres réplicas fue 0.46 ml de bioetanol/ g de macroalga.

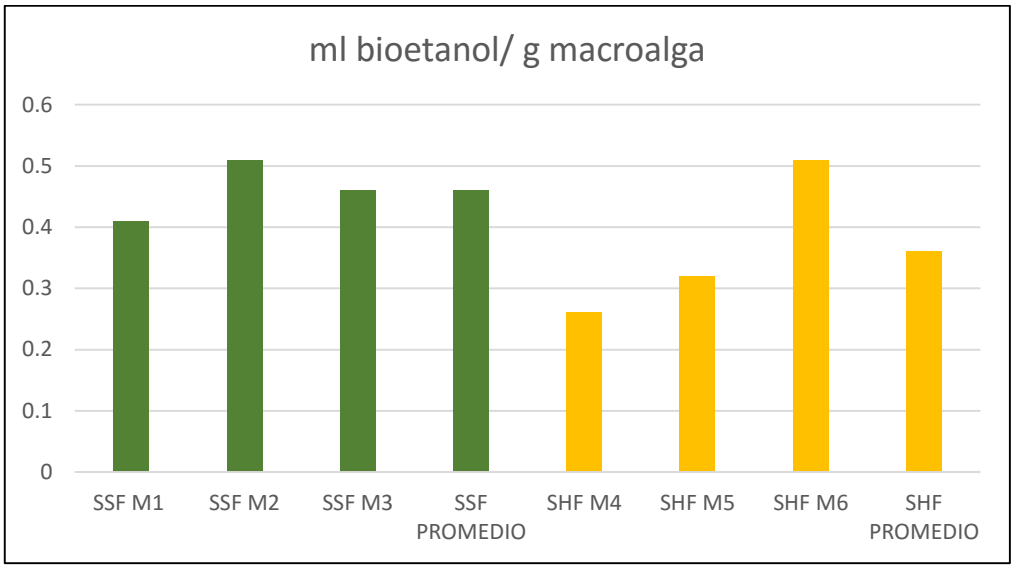


Figura 10: *Comparación de resultados obtenidos en el proceso de Hidrólisis enzimática y fermentación Simultánea (SSF) por muestra realizadas (M1, M2, M3) y su promedio obtenido de este proceso, comparado con el proceso de Hidrólisis enzimática y fermentación Separada (SHF) por muestra realizada (M4, M5, M6) y su promedio obtenido en este proceso.*

Fuente: elaboración propia – 2019.

En la **figura 10,** se puede observar que los resultados obtenidos en el proceso de Hidrólisis enzimática y fermentación simultánea (SSF), se obtuvo mayor cantidad de bioetanol en comparación con el proceso de Hidrólisis enzimática y fermentación separada (SHF). Según la unidad de media ml de bioetanol/ g de macroalga. Y así mismo se obtuvo un promedio mayor de 0,46 ml bioetanol/g macroalga; comparando

con el promedio obtenido en el proceso de hidrólisis enzimática y fermentación separa que fue de 0,36 ml bioetanol/g macroalga.

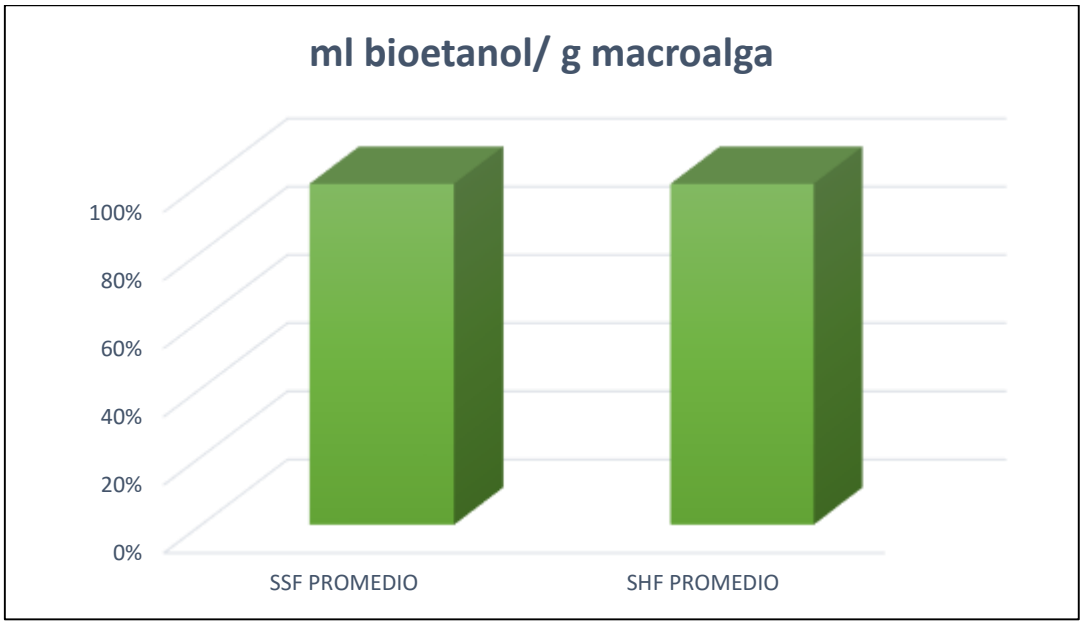


Figura 11: *comparación de promedios de los procesos de Hidrólisis enzimática y fermentación Simultánea (SSF) y el proceso de Hidrólisis enzimática y fermentación Separada (SHF).*
Fuente: elaboración propia – 2019.

En la **Figura 11,** se puede observar los resultados obtenidos de ambos procesos tanto de Hidrólisis enzimática y fermentación simultánea como en el proceso de Hidrólisis enzimática y fermentación separada. Ambos resultados están representados en porcentaje, donde nos da como resultado que el proceso recomendado para producir bioetanol con mayores rendimientos, es el proceso de Hidrólisis enzimática y fermentación simultánea comparando con el otro proceso

el rendimiento mayor es de un 27 % más que el proceso de Hidrólisis enzimática y fermentación separada.

4.5. ANÁLISIS DE RESULTADOS

a) **Análisis de Normalidad,** esta prueba estadística determina si una muestra aleatoria presenta distribución normal. Aplicaremos las siguientes hipótesis:

$H_{0:}$ Los datos se ajustan a la distribución normal.

Ha: Los datos no se ajustan a la distribución normal.

Para determinar cuál de las hipótesis se aceptan, encontraremos el "valor p" (valor de probabilidad), usando el método gráfico de probabilidad normal al 0.05 de nivel de significancia en el programa estadístico Minitab. (**Figura 12 y 13).** Si el valor $p > 0.05$, se acepta la hipótesis nula, de lo contrario se rechazara esta.

Iniciamos haciendo la prueba de normalidad con los datos obtenidos en el proceso de hidrólisis y fermentación separada. Teniendo como resultado valor $p = 0.316$ aceptándose la hipótesis nula.

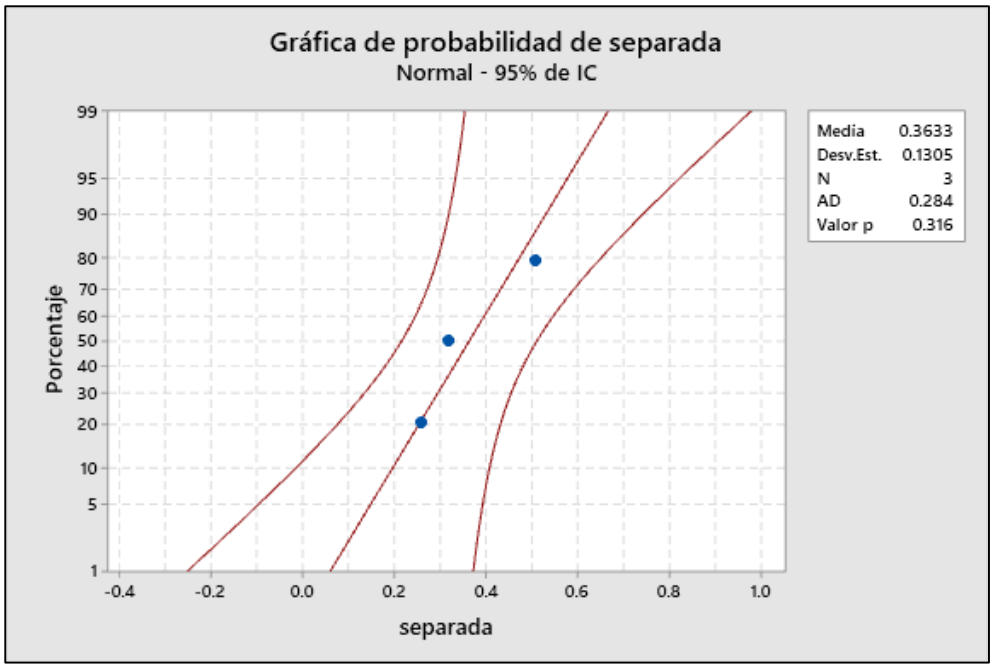


***Figura 12**: Prueba de Normalidad con los resultados obtenidos en el proceso de hidrólisis y fermentación separada.*
Fuente: elaboración propia – 2019.

Continuamos haciendo la prueba de normalidad con los datos obtenidos en el proceso de hidrólisis y fermentación simultánea. Teniendo como resultado valor p = 0.631 aceptándose la hipótesis nula.

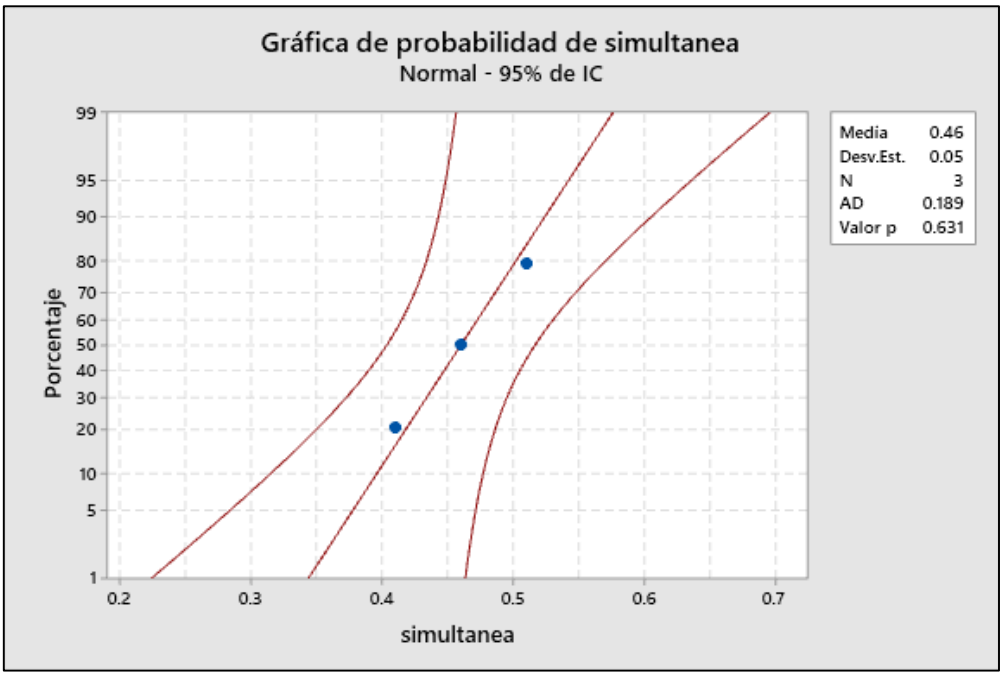


Figura 13: *Prueba de Normalidad con los resultados obtenidos en el proceso de hidrólisis y fermentación simultánea.*
Fuente: elaboración propia – 2019.

b) **Análisis de varianza (ANOVA)** del tratamiento hidrólisis enzimáticas y fermentación separada, y del tratamiento hidrólisis enzimática y fermentación simultánea.

En este trabajo de investigación se usó del Diseño Completamente al Azar (DCA), se definieron en este caso dos tratamientos (proceso de hidrólisis enzimática y fermentación separada y el proceso de hidrólisis enzimática y fermentación simultánea), que se aplicaron aleatoriamente a 6 muestras experimentales (25 g de muestra de biomasa de la macroalga *M. pyrifera* en una solución 500 ml de agua destilada), con 3 repeticiones por cada uno de los dos tratamientos realizados. De acuerdo al modelo estadístico usado se realizó su respectivo análisis de varianza (**ANOVA**), cuyo resultado se muestras en la **Tabla 7**, con un nivel de significancia $\alpha = 0,05$ para evaluar si existen diferencias o no entre los tratamientos.

Tabla 7:
Análisis de varianza.

	Grados Libertad	Suma de Cuadrados	Cuadro Medios	F	*P*
Tratamientos	1	7,86615	7,86615	1,31712034	0,31508261
Error	4	23,88893333	5,97223333		
Total	5	31,75508333			

Fuente: elaboración propia 2019.

De acuerdo a los datos mostrados en la **tabla 7** de análisis de varianza se puede observar el valor "F" calculado es 1,32. Siguiendo el método del ANOVA, al compararlo con el valor "F" de tablas (**Anexo 4**), que es 7.71 se obtiene lo siguiente:

$F_{calculado} = 1,32$

$F_{0.05, 1,4} = 7,71$ (tabla del Anexo 4),

Obtenemos que $F_{calculado} < F_{0,05, 1,4.}$

Además, considerando que la hipótesis del diseño completamente al azar (DCA) empleado en el presente trabajo de investigación, donde la hipótesis nula plantea que los resultados de los tratamientos T1, T2 son iguales. $H_{0:}$ T1=T2; y la hipótesis alterna es que: $H_{a:}$ Al menos un tratamiento es diferente.

Como el $F_{calculao}$ (**tabla 7**), es menor que el F de tabla: $F_{0,05\ ,\ 1,4,}$ (**Anexo 4**) se concluye que la hipótesis nula H_o es verdadera.

Esto quiere decir que en cuanto a la producción de bioetanol mediante el proceso de hidrólisis enzimática y fermentación separada, y el proceso de hidrólisis enzimática y fermentación simultánea, no existen diferencias para las muestras analizadas, a un nivel de significancia de $\alpha = 0,05$. Además el valor *"P"* obtenido es 0,31, valor mayor que el nivel de significancia $\alpha = 0,05$ lo que refuerza que la hipótesis nula es aceptada.

DISCUCIONES

En este trabajo de investigación referido a la obtención de bioetanol a partir de macroalga *M. pyrifera* no se encontró diferencias significativas en los dos procesos, hidrólisis enzimática y fermentación separada e hidrólisis enzimática y fermentación simultánea, según el análisis estadístico de varianza a un nivel de significancia de $\alpha = 0,05$. Mientras Briones (2012), encontró diferencias entre el proceso de hidrólisis enzimática y fermentación separada y el proceso de hidrólisis enzimática y fermentación simultánea en la producción de bioetanol a partir de macroalga *Ulva rígida.*

En el presente trabajo de investigación, dio como resultado que el proceso de hidrólisis enzimática y fermentación separada obtuvo 0.36 en ml de bioetanol/ g de macroalga y el proceso de hidrólisis enzimática y fermentación simultánea obtuvo 0.46 en ml de bioetanol/ g de macroalga. En tanto Molina (2013), en la producción de etanol a partir de la macroalga *U. rigida*, Al comparar los resultados del proceso de hidrólisis enzimática y fermentación simultánea y el proceso de hidrólisis enzimática y fermentación separada con *S. stipitis*, encontró que el proceso de hidrólisis y fermentación simultánea entrega rendimientos de 0,044 [g EtOH/g alga].

En este trabajo de investigación se demostró que es factible la obtención de bioetanol a partir de macroalga *M. pyrifera* mediante los procesos de hidrólisis y fermentación. Asimismo Hernández (2014), señala que las algas no comprometen la seguridad alimentaria y no requieren de grandes extensiones de suelo cultivable; la desventaja es que, hasta el momento, los diversos métodos de obtención se encuentran en etapa experimental.

CONCLUSIONES

- Luego de ejecutar la metodología propuesta y evaluar los resultados podemos concluir de manera general que, después de una fermentación de 72 horas, sí es posible obtener bioetanol a partir de la macroalga *Macrocystis pyrifera.* Tanto en el proceso de hidrólisis enzimática y fermentación simultánea como en el procesos de hidrólisis enzimática y fermentación separada.

- Se concluye que aplicando dos concentraciones de 0% y 2% de ácido sulfúrico a dos temperaturas 30°C y 120°C, para la hidrólisis ácida de la biomasa de la macroalga *Macrocystis pyrifera*, no se libera azúcares reductores a partir de los carbohidratos presentes.

- Además se concluye que mediante el proceso de hidrólisis enzimática y fermentación separada de la macroalga *Macrocystis pyrifera* se obtuvo una producción en promedio de 0,36 ml de bioetanol / g de macroalga y con el proceso de hidrólisis y fermentación simultánea se logró una producción promedio de 0,46 ml de bioetanol /g de macroalga. Sin embargo el análisis estadístico (ANOVA) con cada terna de resultados por cada proceso se encontró que no hay diferencias en la producción de bioetanol entre ellos.

RECOMENDACIONES

- Realizar más estudios para la producción de bioetanol a partir de la macroalga de *Macrocystis pyrifera*, considerando que esta macroalga presenta alto contenido de carbohidratos y la biomasa se puede lograr su producción en las cantidades requeridas mediante la maricultura.

- Realizar más estudios para la optimización de los procesos de hidrólisis para lograr la mayor liberación de azúcares a partir de los carbohidratos de la macroalga *M. pyrifera.*

- Optimizar el proceso de fermentación para la producción de mayores niveles de bioetanol a partir de la macroalga *M. pyrifera.*

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

Cambefort flores, s., & fernando, a. (2010). Efecto de las microalgas chaetoceros gracilis, tetraselmis sp. E isochrysis galbana sobre la reproduccion y desarrollo nauplar en copepodos calanoideos marinos tropicales, acartia spp.

Carlos a. Guevara-bravo1, h. A.-j. (2015). *Hidrólisis endo-enzimatica y produccion de etanol a partir del banano de rechazo.* Colombia.

Donaji jiménez islas1, a. A. (2011). *Obtención de azúcares fermentables mediante hidrólisis ácida de beta vulgaris l.* . Departamento de biotecnología, universidad politécnica de pachuca, mexico.

Harris correa, r. J. (2012). *Selección de pretratamientos en base a caracterización físico química de residuos de eucalyptus globulus y populus canadensis para la producción de bioetanol.*

Leslytejeda1, j. Q. (2011). *Obtención de etanol a partir de residuos de poda, mediante hidrólisis ácida e hidrólisis enzimática* . Cartagena. Cartagena, bolívar (colombia).

Aie. 2006. Bioenergy annual report (2006). Iea headquarters, paris france.

Alveal, k. (1995). Manejo de algas marinas. En manual de métodos ficológicos (eds. Alveal, k., m. Ferrario,e. Oliveira y e. Sar), pp. 825-863. Edicionesuniversidad de concepción, concepción balat mustafa, havvabalat y cahide oz, 2007, progress in bioethanol processing, progress in energy and combustion science, turquía. 23 pp.

Castro-gonzáles m., carrillo-domínguez s. Y f. Pérez-gil (1993) composición química de mucrocystis pyrifera (sargazo gigante) recolectada en verano e invierno y su posible empleo en alimentación animal.

Cruz-suarez l., ricque-marie d., tapia-salazar m. Y c. Guajardo-barbosa (2000) uso de harina de kelp (macrocystis pyrifera) en alimentos para camarón.

Decreto supremo nº 021-2007-em

Dávila b. (2016) obtención de bioetanol a partir de biomasa microalgal cultivada en agua residual empleando ozoflotación como método de cosecha. Universidad nacional autónoma de méxico – mexico.

Fernández-linares l.,montiel-montoya j., millán-oropeza a. Y badillo-corona j.(2012) producción de biocombustibles a partir de microalgas. Mexico.

Graham, m.h:, j.a. Vazquez, a.h. Buschmann. 2007. Global ecology of the giant kelp macrocystis: from ecotypes to ecosystems. Oceanography and marine biology: an annual review 45: 39-88

Hauenstein, e., gonzález, m. 1994. Biología de las algas y plantas acuáticas. Manual de actividades prácticas. Universidad católica de temuco. Chile.

Hernández r. (2014) análisis de la productividad industrial de bioetanol. Universidad veracruzana

Imarpe (2012) estudios sobre macroalgas pardas en el sur del perú. 2011 – 2015. Informe. Instituto del mar del perú.

Imarpe (24 de diciembre de 2018) estudios de poblaciones de macroalgas.instituto del mar del perú. Recuperado.

Machado, c.(2010)situación de los biocombustibles de 2da y 3era generación en américa latina y caribe. En: v seminario latinoamericano y del caribe de biocombustibles.

Molina, j.(2013) producción de bioetanol a partir de algas utilizando la levadura *scheffersomyces stipitis.* Universidad de chile. Santiago de chile.

Mann, k. (1973) seaweeds: their productivity and strategy for growth. Science 182: 975-981.

Nigam, p.s., singh, a.(2010) production of liquid biofuels from renewable resources.progress energ. Combust.

Leyton c. (2015) condiciones óptimas de fermentación de carbohidratos de algas pardas, mediante el uso de organismos genéticamente modificados. Universidad de chile.

Orellana, j. (2015) rendimientos de cultivo de macrocystis integrifolia según método de siembra en long-line, a partir de bastidores con esporas, en la localidad de bahía inglesa, iii región. Pontificia universidad católica de valparaíso.

Peso-echarri p., frontela-saseta, c. & gonzález-bermúdaz, c.(2012)polysaccharides from seaweed as ingredients in marine aquaculture feeding: alginate,carrageenan and ulvan. Revista de biología marina y oceanografía. 47(3): 373-381.

Peteiro c., prado o. Y garcia-tasende m. (2015) el cultivo de macroalgas marinas como una fuente renovable y limpia para producir bioetanol como biocarburante.

Piel, m., m. Ávila, c. Merino c & k. Guissen. 2011. Manual de cultivo de macroalgas pardas: desde el laboratorio al océano. Proyecto “programa de manejo, cultivo y repoblamiento para las algas pardas en la región de tarapacá”. Fic gobierno regional tarapacá. Universidad arturo prat. 36 pp

Plana, j., mansilla, a., palacios, m., navarro, n. (2007) estudio poblacional de *macrocystis pyrifera* l.c. Agarhd (laminariales: phaeophyta) en ambientes protegidos y expuestos al oleaje en tierra del fuego. Gayana 71(1): 66-75.

Salavarría e. (2014) análisis de la variabilidad genética de macrocystis spp. (laminariales) en la costa centro sur del perú, empleando marcadores mitocondriales. Universidad agraria la molina. Lima perú.

Segura j. (2000) notas de diseños experimentales. Universidad autónoma de yucatán.

Stephanopoulos, g., fischer, c. R. Y klein-marcuschamer, d. 2008. Selection and optimization of microbial hosts for biofuels production. Metabolic engineering. 10(6): 295–304

Taherzadeh, m. Y karimi, k.(2007) 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.

Timilsina, g. R., y shrestha, a. (2011). How much hope should we have for biofuels?. Energy.

Vásquez, j.a. & e. Fonk. 1994. Algas productoras de ácido algínico en sudamérica: diagnóstico y proyecciones. Es: documento de campo n º 13 situación

actual de la industria de macroalgas productoras de ficocoloides en américa latina y el caribe.fao-italia. Programa cooperativo gubernamental: 17-26.

Vázquez h.j. & dacosta o. (2007) fermentación alcohólica: una opción para la producción de energía renovable a partir de desechos agrícolas. Ingeniería, investigación y tecnología

cambefort flores, s., & fernando, a. (2010). Efecto de las microalgas chaetoceros gracilis, tetraselmis sp. E isochrysis galbana sobre la reproduccion y desarrollo nauplar en copepodos calanoideos marinos tropicales, acartia spp.

Niklitschek, t. A. (2010). Selección de condiciones de fermentación de residuos de lenga para la producción de bioetanol. Santiago de chile.

ANEXOS

ANEXO 1: FICHA DE LA ENZIMA celulasa de la marca ROHAMENT® CL

AB Enzymes

ROHAMENT® CL

Description and Specification

2007-10-12
Rev. Nr. 06

Description

ROHAMENT® CL is an enzyme preparation for degradation cellulose und other viscosity increasing non-starch polysaccharides such as xylans and ß-glucans. ROHAMENT® CL works best at acid pH range. It is obtained from *Trichoderma reesei*.

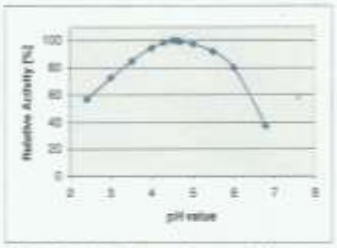
- IUB-No.: 3.2.1.4
- CAS-No.: 9012-54-8

Properties

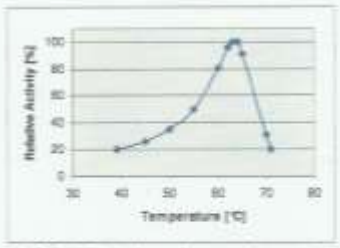
ROHAMENT® CL has the following properties:

a) liquid product
b) light brown colour with characteristic smell
c) specific weight: ca. 1,1 g/ml

pH- und temperature optimum:



• Fig. 1: Activity in dependence on pH



• Fig. 2: Activity in dependence on temperature

Activity

ROHAMENT® CL contains a declared minimum activity of 15.000 ECU g $^{-1}$.
A description of the analysis method is available on request.

1 / 3

® Registered Trademark

AB Enzymes GmbH
Distributor of ROAL's products
Postfach 101239
64212 Darmstadt
Germany
Tel: +49 (0) 6151 3680 100
Fax: +49 (0) 6151 3680 120

Application

ROHAMENT® CL can be used for the following applications:

- *Fruit and vegetable processing:*
  ROHAMENT® CL is used for many applications in fruit and vegetable processing, mainly in combination with pectinases. The hydrolysis of non-starch polysaccharides, especially cellulose, ß-glucans and xylans results in viscosity reduction.
- *Distilling:*
  Cereals and potatos contain non-starch carbohydrates, which are partly linked to starch. They partly inhibit the enzymatic starch hydrolysis and lead to high viscosity of the mash. The use of ROHAMENT® CL reduces the viscosity and improves the strach degradation. Thereby the pressure rise in the heat exchangers is reduced and less energy for pumps, stirrers and steam in distillation is required.
- *Brewery:*
  In breweries ROHAMENT® CL is used to compensate disadvantageous malt quality and to ease the use of other raw materials such as wheat and barley. The use of ROHAMENT® CL can accelerate lautering, improve filterability, prevent glucan haze and increase extract yield.

Dosage

The dosage depends on the reaction conditions such as substrate, pH, temperature and reaction time.

Typical dosages are:

- *Fruit and vegetable processing:*

Application	Reaction conditions	Dosage
Carrot juice	pH 5 – 6 / 50 °C / 1 – 2 h in combination with ROHAPECT® PTE	100 g / t
Pome fruits • Maceration • Pomace Maceration	50 °C / 1 – 2 h 50 °C / 2 – 3 h	100 – 150 g / t 150 – 200 g / t
Other Fruits	50 °C / 1 – 2 h	50 – 100 g / t

- *Distilling:*
  100 – 150 ml / t raw material
- *Brewery:*
  + in the brew house: 50 – 150 ml / t malt (added at the beginning of mashing process)
  + in the fermenter: 0,5 – 1,0 ml / hl wort (added at the beginning of the main fermentation)

AB Enzymes GmbH
Distributor of ROAL's products
Postfach 101239
64212 Darmstadt
Germany
Tel: +49 (0) 6151 3680 100
Fax: +49 (0) 6151 3680 120

Specification

The product complies with the recommended specifications of the FAO/WHO's Joint Expert Committee on Food Additives (JECFA) and the Food Chemicals Codex (FCC) for food-grade enzymes.
The total viable counts are within the upper limit of 5×10^4 / g.

Packaging

ROHAMENT® CL is available in 25-kg PE cans and in 220-kg drums.

Storage

ROHAMENT® CL can be stored at cool and dry conditions (6 – 10 °C) in original packaging for 12 months.

Safety Handling

Avoid the formation of aerosol and dust of the product. Repeated inhalation of enzyme aerosol or dust may cause sensitisation and may cause allergic type reactions in sensitised individuals. For detailed information please refer to the Material Safety Data Sheet (MSDS).

Our technical advice on the uses of our products is given without obligation. Neither Roal, the principal, nor AB Enzymes, as distributor of Roal Oy's products, are not responsible for the application and processing of the products by the customer or any third party. The customer is solely liable to comply with the applicable laws and regulations and with intellectual property rights of third parties.
This information contains product specifications which may be altered without prior notice.

ANEXO 2: INFORME DE EVALUACIÓN DE DOS CONCENTRACIONES DE ÁCIDO Y DOS TEMPERATURAS PARA HIDRÓLISIS ÁCIDA DE LA MACROALGA *Macrocystis pyrifera.*



"año de la lucha contra la corrupción y la impunidad"

INFORME N° 08 – 2019 – YLVCH

A : DAYSI ELIZABETH BUTRÓN RUIZ
Tesista

DE : YESICA LUZ VILCANQUI CHURA
Ingeniero Agroindustrial

ASUNTO : INFORME DE TRABAJO DE LABORATORIO

FECHA : 20 de diciembre del 2018

Es grato dirigirme a Usted, para saludarlo muy cordialmente y al mismo tiempo informarle sobre los resultados obtenidos en cuanto al tratamiento de la biomasa de la alga parda *M. pyrifera* con dos concentraciones de ácido sulfúrico [0%] y [2%] a dos temperature 30°C y 120°C, al respecto debo indicar que en ningún caso se registró liberación de azucares reductores producto de hidrólisis ácida de la alga parda, esto se evidencio cuando se trató con reactivo de Fehling a la fracción liquida de la muestra.

Es todo cuanto informo para su conocimiento y fines pertinentes.

Atentamente.

ANEXO 3: INFORME DE RESULTADOS OBTENIDO POR HIDRÓLISIS ENZIMATICA DE LA MACROALGA *M. pyrifera.*



UNSA

LABINVSERV
Laboratorio de Investigación y Servicios

INFORME DE ENSAYOS

Nº DE REPORTE:	**21367-19**
CLIENTE:	DAYSI ELIZABETH BUTRON RUIZ
DIRECCIÓN:	ILO
ENSAYO SOLICITADO:	ANÁLISIS FISICO QÚIMICO
PRODUCTO	ALGAS PARDAS MARINAS HIDROLIZADA Y FERMENTADA
CANTIDAD DE MUESTRA	01
FECHA DE RECEPCION:	Miércoles 31 de julio de 2019
CARACTERISTICAS Y CONDICIONES:	BOTELLA DE PLASTICO
FECHA DE ENTREGA DE RESULTADOS:	Viernes 02 de agosto de 2019
REFERENCIA	MUESTRA PROPORCIONADA POR EL CLIENTE
PROCEDENCIA	**M – 1 ILO**
CÓDIGO DE MUESTRA	27392

LOS RESULTADOS OBTENIDOS CORRESPONDEN AL ANÁLISIS SOLICITADO EN LA MUESTRA RECIBIDA.
ESTE FORMATO NO SERÁ REPRODUCIDO SIN AUTORIZACIÓN DEL LABORATORIO LABINVSERV

Página 1 de 2

UNSA

LABINVSERV
Laboratorio de Investigación y Servicios

INFORME DE ENSAYOS

REPORTE N°: 21367-19

ANÁLISIS DE:	UNIDAD	RESULTADOS	METODO DE ENSAYO APLICADO NORMA/REFERENCIA/NOMBRE
Grado Alcohólico A 20°C	GL	2,05	Método NTN 210.011

OBSERVACIONES:

Emitido en Arequipa, el 02 de agosto de 2019.

Dr. Juan Reyes Larico
Jefe de Laboratorio
RCQP – 348

Lic. Fredy Valdivia Peña
Químico Responsable
RCQP - 842

UNSA

LABINVSERV
Laboratorio de Investigación y Servicios

INFORME DE ENSAYOS

Nº DE REPORTE:	**21368-19**
CLIENTE:	DAYSI ELIZABETH BUTRON RUIZ
DIRECCIÓN:	ILO
ENSAYO SOLICITADO:	ANÁLISIS FISICO QUIMICO
PRODUCTO	ALGAS PARDAS MARINAS HIDROLIZADA Y FERMENTADA
CANTIDAD DE MUESTRA	01
FECHA DE RECEPCION:	Miércoles 31 de julio de 2019
CARACTERISTICAS Y CONDICIONES:	BOTELLA DE PLASTICO
FECHA DE ENTREGA DE RESULTADOS:	Viernes 02 de agosto de 2019
REFERENCIA	MUESTRA PROPORCIONADA POR EL CLIENTE
PROCEDENCIA	**M – 2 ILO**
CÓDIGO DE MUESTRA	27393

LOS RESULTADOS OBTENIDOS CORRESPONDEN AL ANÁLISIS SOLICITADO EN LA MUESTRA RECIBIDA.
ESTE FORMATO NO SERÁ REPRODUCIDO SIN AUTORIZACIÓN DEL LABORATORIO LABINVSERV

UNSA

LABINVSERV
Laboratorio de Investigación y Servicios

INFORME DE ENSAYOS

REPORTE Nº: 21368-19

ANÁLISIS DE:	UNIDAD	RESULTADOS	METODO DE ENSAYO APLICADO NORMA/REFERENCIA/NOMBRE
Grado Alcohólico A 20ºC	GL	2,54	Método NTN 210.011

OBSERVACIONES:

Emitido en Arequipa, el 02 de agosto de 2019.

Dr. Juan Reyes Larico
Jefe de Laboratorio
RCQP - 348

Lic. Fredy Valdivia Pelle
Químico Responsable
RCQP - 942

UNSA

LABINVSERV
Laboratorio de Investigación y Servicios

INFORME DE ENSAYOS

Nº DE REPORTE:	**21369-19**
CLIENTE:	DAYSI ELIZABETH BUTRON RUIZ
DIRECCIÓN:	ILO
ENSAYO SOLICITADO:	ANÁLISIS FISICO QUIMICO
PRODUCTO	ALGAS PARDAS MARINAS HIDROLIZADA Y FERMENTADA
CANTIDAD DE MUESTRA	01
FECHA DE RECEPCION:	Miércoles 31 de julio de 2019
CARACTERISTICAS Y CONDICIONES:	BOTELLA DE PLASTICO
FECHA DE ENTREGA DE RESULTADOS:	Viernes 02 de agosto de 2019
REFERENCIA	MUESTRA PROPORCIONADA POR EL CLIENTE
PROCEDENCIA	**M – 3 ILO**
CÓDIGO DE MUESTRA	27394

LOS RESULTADOS OBTENIDOS CORRESPONDEN AL ANÁLISIS SOLICITADO EN LA MUESTRA RECIBIDA.
ESTE FORMATO NO SERÁ REPRODUCIDO SIN AUTORIZACIÓN DEL LABORATORIO LABINVSERV

UNSA

LABINVSERV
Laboratorio de Investigación y Servicios

INFORME DE ENSAYOS

REPORTE Nº: 21369-19

ANALISIS DE:	UNIDAD	RESULTADOS	METODO DE ENSAYO APLICADO NORMA, REFERENCIA/NOMBRE
Grado Alcohólico A 20ºC	GL	2,32	Método NTN 210.011

OBSERVACIONES:

Emitido en Arequipa, el 02 de agosto de 2019.

Dr. Juan Reyes Larico
Jefe de Laboratorio
RCQP – 348

Lic. Fredy Valdivia Peña
Químico Responsable
RCQP - 842

UNSA

LABINVSERV
Laboratorio de Investigación y Servicios

INFORME DE ENSAYOS

Nº DE REPORTE:	**21370-19**
CLIENTE:	DAYSI ELIZABETH BUTRON RUIZ
DIRECCIÓN:	ILO
ENSAYO SOLICITADO:	ANÁLISIS FISICO QUÌMICO
PRODUCTO	ALGAS PARDAS MARINAS HIDROLIZADA Y FERMENTADA
CANTIDAD DE MUESTRA	01
FECHA DE RECEPCION:	Miércoles 31 de julio de 2019
CARACTERISTICAS Y CONDICIONES:	BOTELLA DE PLASTICO
FECHA DE ENTREGA DE RESULTADOS:	Viernes 02 de agosto de 2019
REFERENCIA	MUESTRA PROPORCIONADA POR EL CLIENTE
PROCEDENCIA	**M – 4 ILO**
CÓDIGO DE MUESTRA	27395

LOS RESULTADOS OBTENIDOS CORRESPONDEN AL ANÁLISIS SOLICITADO EN LA MUESTRA RECIBIDA.
ESTE FORMATO NO SERÁ REPRODUCIDO SIN AUTORIZACIÓN DEL LABORATORIO LABINVSERV

UNSA

LABINVSERV
Laboratorio de Investigación y Servicios

INFORME DE ENSAYOS

REPORTE N°: 21370-19

ANALISIS DE:	UNIDAD	RESULTADOS	METODO DE ENSAYO APLICADO NORMA/REFERENCIA/NOMBRE
Grado Alcohólico A 20°C	GL	1,30	Método NTN 210.011

OBSERVACIONES:

Emitido en Arequipa, el 02 de agosto de 2019

Dr. Juan Reyes Larico
Jefe de Laboratorio
RCQP - 348

Lic. Freddy Valdivia Pinto
Químico Responsable
RCQP - 842

UNSA

LABINVSERV
Laboratorio de Investigación y Servicios

INFORME DE ENSAYOS

Nº DE REPORTE:	**21371-19**
CLIENTE:	DAYSI ELIZABETH BUTRON RUIZ
DIRECCIÓN:	ILO
ENSAYO SOLICITADO:	ANÁLISIS FISICO QUIMICO
PRODUCTO	ALGAS PARDAS MARINAS HIDROLIZADA Y FERMENTADA
CANTIDAD DE MUESTRA	01
FECHA DE RECEPCION:	Miércoles 31 de julio de 2019
CARACTERISTICAS Y CONDICIONES:	BOTELLA DE PLASTICO
FECHA DE ENTREGA DE RESULTADOS:	Viernes 02 de agosto de 2019
REFERENCIA	MUESTRA PROPORCIONADA POR EL CLIENTE
PROCEDENCIA	**M – 5 ILO**
CÓDIGO DE MUESTRA	27396

LOS RESULTADOS OBTENIDOS CORRESPONDEN AL ANÁLISIS SOLICITADO EN LA MUESTRA RECIBIDA.
ESTE FORMATO NO SERÁ REPRODUCIDO SIN AUTORIZACIÓN DEL LABORATORIO LABINVSERV

UNSA

LABINVSERV
Laboratorio de Investigación y Servicios

INFORME DE ENSAYOS

REPORTE Nº: 21371-19

ANALISIS DE:	UNIDAD	RESULTADOS	METODO DE ENSAYO APLICADO NORMA/REFERENCIA/NOMBRE
Grado Alcohólico A 20ºC	GL	1,59	Método NTN 210.011

OBSERVACIONES:

Emitido en Arequipa, el 02 de agosto de 2019.

Dr. Juan Reyes Larico
Jefe de Laboratorio
RCQP – 348

Lic. Freddy Valdivia Pinto
Químico Responsable
RCQP - 842

UNSA

LABINVSERV
Laboratorio de Investigación y Servicios

INFORME DE ENSAYOS

Nº DE REPORTE:	**21372-19**
CLIENTE:	DAYSI ELIZABETH BUTRON RUIZ
DIRECCIÓN:	ILO
ENSAYO SOLICITADO:	ANÁLISIS FISICO QUIMICO
PRODUCTO	ALGAS PARDAS MARINAS HIDROLIZADA Y FERMENTADA
CANTIDAD DE MUESTRA	01
FECHA DE RECEPCION:	Miércoles 31 de julio de 2019
CARACTERISTICAS Y CONDICIONES:	BOTELLA DE PLASTICO
FECHA DE ENTREGA DE RESULTADOS:	Viernes 02 de agosto de 2019
REFERENCIA	MUESTRA PROPORCIONADA POR EL CLIENTE
PROCEDENCIA	**M – 6 ILO**
CÓDIGO DE MUESTRA	27397

LOS RESULTADOS OBTENIDOS CORRESPONDEN AL ANÁLISIS SOLICITADO EN LA MUESTRA RECIBIDA.
ESTE FORMATO NO SERÁ REPRODUCIDO SIN AUTORIZACIÓN DEL LABORATORIO LABINVSERV

UNSA

LABINVSERV
Laboratorio de Investigación y Servicios

INFORME DE ENSAYOS

REPORTE N°: 21372-19

ANÁLISIS DE:	UNIDAD	RESULTADOS	METODO DE ENSAYO APLICADO NORMA/ REFERENCIA/NOMBRE
Grado Alcohólico A 20°C	GL	2,56	Método NTN 210.011

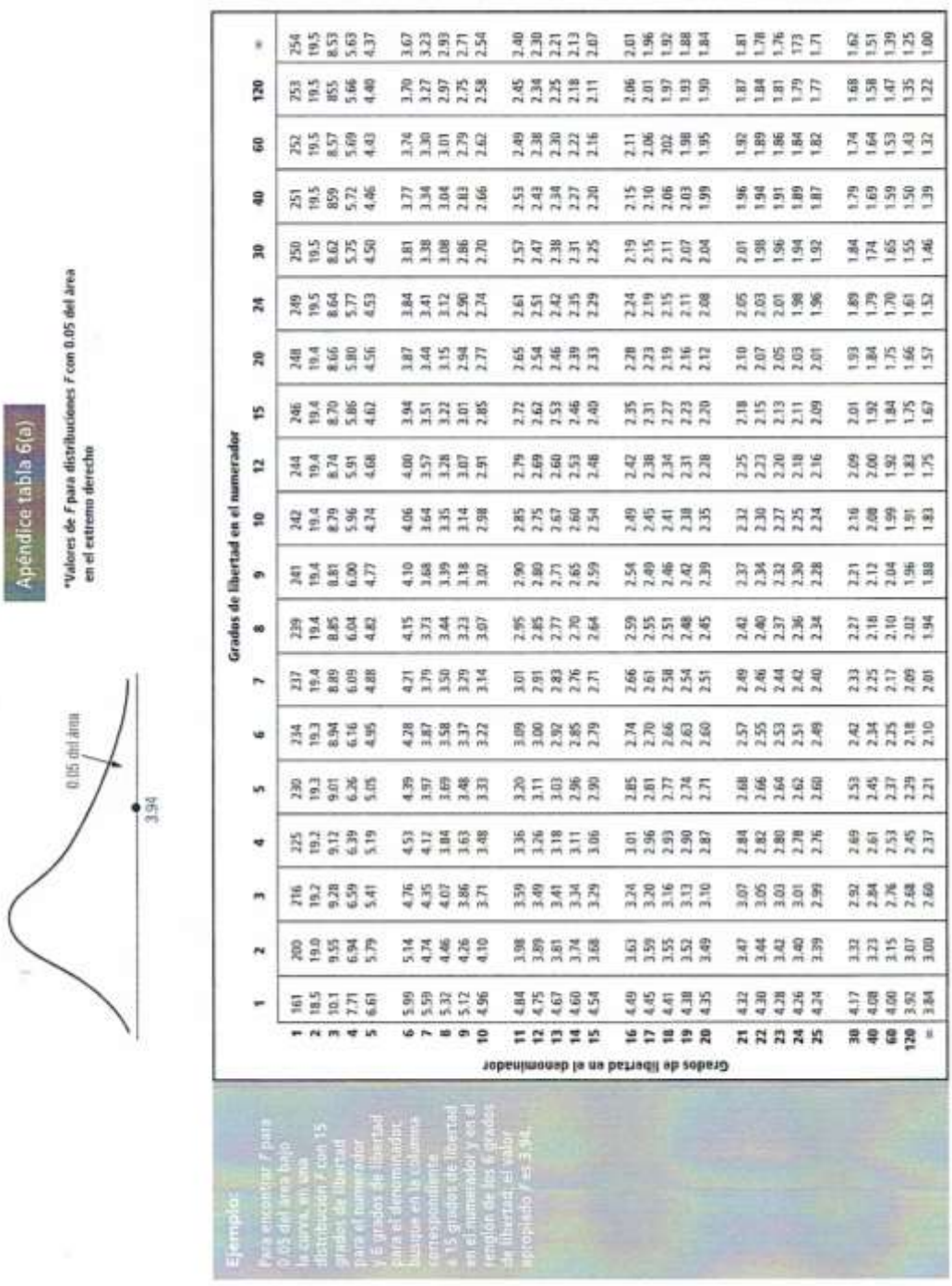
OBSERVACIONES:

Emitido en Arequipa, el 02 de agosto de 2019.

Dr. Juan Reyes Larico
Jefe de Laboratorio
RCQP – 348

Lic. Fredy Valdivia Peña
Químico Responsable
RCQP - 842

ANEXO 4: Tabla de valores de F para distribuciones *F* con 0,05 del área en el extremo derecho.



Apéndice tabla 6(a)

*Valores de *F* para distribuciones *F* con 0.05 del área en el extremo derecho

0.05 del área

3.94

Ejemplo:
Para encontrar *F* para 0.05 del área bajo la curva, en una distribución *F* con 15 grados de libertad para el numerador y 8 grados de libertad para el denominador, busque en la columna correspondiente a 15 grados de libertad en el numerador y en el renglón de los 8 grados de libertad el valor apropiado *F* = 3.94.

Grados de libertad en el denominador	Grados de libertad en el numerador																				
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	12	15	20	24	30	40	60	120	∞
1	161	200	216	225	230	234	237	239	241	242	244	246	248	249	250	251	252	253	254
2	18.5	19.0	19.2	19.2	19.3	19.3	19.4	19.4	19.4	19.4	19.4	19.4	19.4	19.5	19.5	19.5	19.5	19.5	19.5
3	10.1	9.55	9.28	9.12	9.01	8.94	8.89	8.85	8.81	8.79	8.74	8.70	8.66	8.64	8.62	859	8.57	855	8.53
4	7.71	6.94	6.59	6.39	6.26	6.16	6.09	6.04	6.00	5.96	5.91	5.86	5.80	5.77	5.75	5.72	5.69	5.66	5.63
5	6.61	5.79	5.41	5.19	5.05	4.95	4.88	4.82	4.77	4.74	4.68	4.62	4.56	4.53	4.50	4.46	4.43	4.40	4.37
6	5.99	5.14	4.76	4.53	4.39	4.28	4.21	4.15	4.10	4.06	4.00	3.94	3.87	3.84	3.81	3.77	3.74	3.70	3.67
7	5.59	4.74	4.35	4.12	3.97	3.87	3.79	3.73	3.68	3.64	3.57	3.51	3.44	3.41	3.38	3.34	3.30	3.27	3.23
8	5.32	4.46	4.07	3.84	3.69	3.58	3.50	3.44	3.39	3.35	3.28	3.22	3.15	3.12	3.08	3.04	3.01	2.97	2.93
9	5.12	4.26	3.86	3.63	3.48	3.37	3.29	3.23	3.18	3.14	3.07	3.01	2.94	2.90	2.86	2.83	2.79	2.75	2.71
10	4.96	4.10	3.71	3.48	3.33	3.22	3.14	3.07	3.02	2.98	2.91	2.85	2.77	2.74	2.70	2.66	2.62	2.58	2.54
11	4.84	3.98	3.59	3.36	3.20	3.09	3.01	2.95	2.90	2.85	2.79	2.72	2.65	2.61	2.57	2.53	2.49	2.45	2.40
12	4.75	3.89	3.49	3.26	3.11	3.00	2.91	2.85	2.80	2.75	2.69	2.62	2.54	2.51	2.47	2.43	2.38	2.34	2.30
13	4.67	3.81	3.41	3.18	3.03	2.92	2.83	2.77	2.71	2.67	2.60	2.53	2.46	2.42	2.38	2.34	2.30	2.25	2.21
14	4.60	3.74	3.34	3.11	2.96	2.85	2.76	2.70	2.65	2.60	2.53	2.46	2.39	2.35	2.31	2.27	2.22	2.18	2.13
15	4.54	3.68	3.29	3.06	2.90	2.79	2.71	2.64	2.59	2.54	2.48	2.40	2.33	2.29	2.25	2.20	2.16	2.11	2.07
16	4.49	3.63	3.24	3.01	2.85	2.74	2.66	2.59	2.54	2.49	2.42	2.35	2.28	2.24	2.19	2.15	2.11	2.06	2.01
17	4.45	3.59	3.20	2.96	2.81	2.70	2.61	2.55	2.49	2.45	2.38	2.31	2.23	2.19	2.15	2.10	2.06	2.01	1.96
18	4.41	3.55	3.16	2.93	2.77	2.66	2.58	2.51	2.46	2.41	2.34	2.27	2.19	2.15	2.11	2.06	202	1.97	1.92
19	4.38	3.52	3.13	2.90	2.74	2.63	2.54	2.48	2.42	2.38	2.31	2.23	2.16	2.11	2.07	2.03	1.98	1.93	1.88
20	4.35	3.49	3.10	2.87	2.71	2.60	2.51	2.45	2.39	2.35	2.28	2.20	2.12	2.08	2.04	1.99	1.95	1.90	1.84
21	4.32	3.47	3.07	2.84	2.68	2.57	2.49	2.42	2.37	2.32	2.25	2.18	2.10	2.05	2.01	1.96	1.92	1.87	1.81
22	4.30	3.44	3.05	2.82	2.66	2.55	2.46	2.40	2.34	2.30	2.23	2.15	2.07	2.03	1.98	1.94	1.89	1.84	1.78
23	4.28	3.42	3.03	2.80	2.64	2.53	2.44	2.37	2.32	2.27	2.20	2.13	2.05	2.01	1.96	1.91	1.86	1.81	1.76
24	4.26	3.40	3.01	2.78	2.62	2.51	2.42	2.36	2.30	2.25	2.18	2.11	2.03	1.98	1.94	1.89	1.84	1.79	173
25	4.24	3.39	2.99	2.76	2.60	2.49	2.40	2.34	2.28	2.24	2.16	2.09	2.01	1.96	1.92	1.87	1.82	1.77	1.71
30	4.17	3.32	2.92	2.69	2.53	2.42	2.33	2.27	2.21	2.16	2.09	2.01	1.93	1.89	1.84	1.79	1.74	1.68	1.62
40	4.08	3.23	2.84	2.61	2.45	2.34	2.25	2.18	2.12	2.08	2.00	1.92	1.84	1.79	174	1.69	1.64	1.58	1.51
60	4.00	3.15	2.76	2.53	2.37	2.25	2.17	2.10	2.04	1.99	1.92	1.84	1.75	1.70	1.65	1.59	1.53	1.47	1.39
120	3.92	3.07	2.68	2.45	2.29	2.18	2.09	2.02	1.96	1.91	1.83	1.75	1.66	1.61	1.55	1.50	1.43	1.35	1.25
∞	3.84	3.00	2.60	2.37	2.21	2.10	2.01	1.94	1.88	1.83	1.75	1.67	1.57	1.52	1.46	1.39	1.32	1.22	1.00

*Tomado de M. Merrington y C.M. Thompson, *Biometrika 33* (1943).

ANEXO 5: MATRIZ DE CONSISTENCIA DEL TRABAJO DE INVESTIGACION

PROBLEMA	**OBJETIVOS**	**HIPÓTESIS**	**VARIABLES**	**METODOLOGÍA**
INTERROGANTE GENERAL -¿Con cuál proceso de hidrólisis y fermentación se obtiene bioetanol a partir de la macroalga Macrocystis pyrifera? **INTERROGANTES ESPECÍFICOS** -¿Qué concentración de 0% y 2% v/v de H2SO4 a dos temperaturas de 30°C y 120°C son las más adecuadas para la hidrólisis ácida de la macroalga *Macrocystis pyrifera?*	**OBJETIVO GENERAL** Obtener bioetanol a partir de la macroalga *Macrocystis pyrifera*, mediante los procesos de hidrólisis y fermentación. **OBJETIVOS ESPECÍFICOS** □Evaluar dos concentraciones de 0% y 2% v/v de H2SO4 a dos temperaturas de 30°C y 120°C en la hidrólisis ácida de la	**HIPÓTESIS GENERAL** - Aplicando los procesos de hidrólisis y fermentación, se obtiene bioetanol a partir de la macroalga Macrocystis pyrifera, debido al alto contenido de carbohidratos en su composición. **HIPÓTESIS ESPECÍFICAS** -Existen diferencias en la aplicación de dos concentraciones de 0% y 2% v/v de H2SO4 a dos temperaturas 30°C y 120°C para la hidrólisis ácida de la	**VARIABLES INDEPENDIENTE** Concentración de ácido sulfúrico. Temperatura. Concentración de enzima celulasa. Concentración de levadura *Saccharomyces cerevisiae.* **VARIABLE DEPENDIENTE** Liberación de azúcares reductores. Concentración de bioetanol.	**TIPO DE INVESTIGACIÓN** El tipo de investigación es principalmente Aplicada**.** **LÍNEA DE INVESTIGACIÓN DE LA ESCUELA PROFESIONAL DE INGENIERÍA AMBIENTAL.** Desarrollo Sustentable **DISEÑO DE INVESTIGACIÓN** El diseño completamente al azar (DCA).

-¿Cuáles son los niveles de producción de bioetanol mediante los procesos de hidrólisis enzimática y fermentación separada en comparación con el proceso de hidrólisis enzimática y fermentación simultánea de la macroalga *Macrocystis pyrifera?*	macroalga *Macrocystis pyrifera*. Determinar los niveles de producción de bioetanol mediante los procesos de hidrólisis enzimática y fermentación separada en comparación con el proceso de hidrólisis enzimática y fermentación simultánea de la macroalga *Macrocystis pyrifera*.	macroalga *Macrocystis pyrifera*. -Existen diferencias en los niveles de producción de bioetanol mediante los procesos de hidrólisis enzimática y fermentación separada en comparación con el proceso de hidrólisis enzimática y fermentación simultánea de la macroalga *Macrocystis pyrifera*.		**NIVEL DE INVESTIGACIÓN** El nivel de investigación es experimental.

Fuente: elaboración propia – 2019.

ANEXO 6: IMÁGENES DE LOS PROCEDIMIENTOS REALIZADOS.



Figura 14: *Muestra de biomasa de macroalgas Macrocystis pyrifera. (A) a la izquierda se observa la macroalga M. pyrifera seca luego del proceso de secado por 3 días. Y a la derecha (B) el proceso de molienda de la macroalga. (C) el proceso tamizado de la macroalga molida con un tamizador de 450 µm. (D) muestra obtenida para realizar el proceso de fermentación.*

Fuente: fotografía propia – 2019.



Figura 15: *Muestra tamizada obtenida, para realizar el proceso de Sacarificación y fermentación Separada y simultánea.*
Fuente: fotografía propia – 2019.



Figura 36: *Análisis de Hidrólisis Ácida.*
Fuente: fotografía propia – 2019.

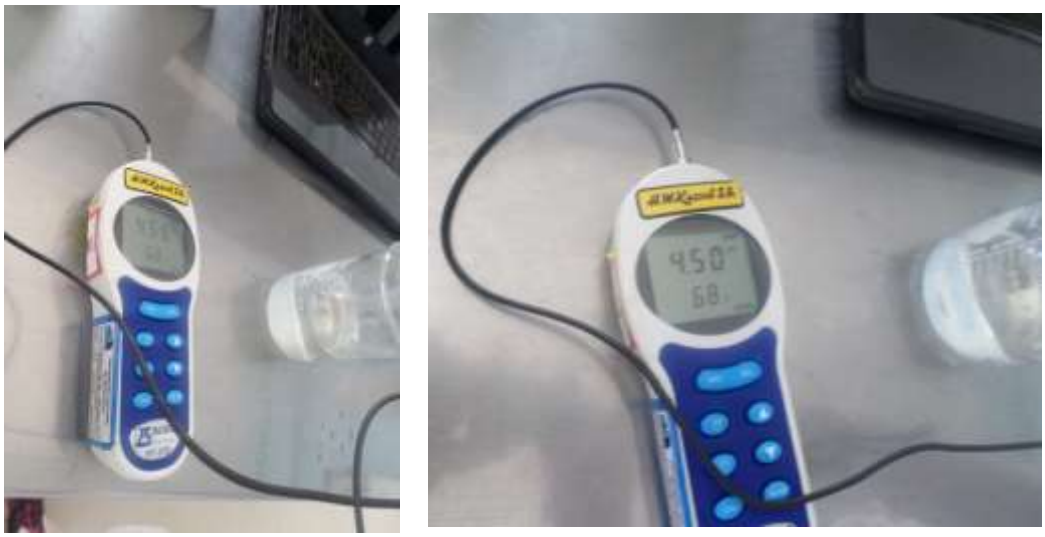


Figura 17: *Medición de pH del tratamiento de Hidrólisis Ácida. Arrojando las muestras pH 4,5, 4,5 óptimo para el proceso.*
Fuente: fotografía propia – 2019.





Figura 18: *Análisis de Sacarificación y fermentación Separada y Simultánea en el laboratorio de la Universidad Nacional de Moquegua filial Ilo.*
Fuente: fotografía propia – 2019.



Figura 19: *Tratamiento de Hidrólisis Enzimática.*
Fuente: fotografía propia – 2019.