



UNIVERSIDAD DE CUENCA
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS
ESCUELA DE INGENIERÍA QUÍMICA

“Modelado de la ecuación de Gompertz modificado para la producción de bioetanol en procesos fermentativos dentro de un reactor tipo batch a partir de mucílago de cacao CCN-51”. Caso: Ecuador - Zona 6

TRABAJO DE TITULACIÓN PREVIO A LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO DE INGENIERO QUÍMICO

AUTOR:

Jean Carlo Orellana Valarezo – 070662733 - 8

DIRECTOR:

MGT. Jorge Washington Delgado Noboa – 010359941 - 1

CUENCA – ECUADOR

2018

RESUMEN

El mucílago de cacao es un residuo de la industria cacaotera que debido a su contenido de azúcares puede ser aprovechado como materia prima en procesos fermentativos para la producción de bioetanol. El objetivo de esta investigación es desarrollar el modelo matemático de la ecuación de Gompertz modificado para predecir la producción de bioetanol generado en la fermentación de mucílago de Cacao CCN-51 con levadura del tipo *Saccharomyces cerevisiae*, en condiciones óptimas de operación (pH, temperatura, concentración de levadura). La optimización se realizó mediante diseño factorial completo 2^3 (dos niveles y tres variables: temperatura, pH y concentración de levadura). La fermentación se realizó en un biorreactor discontinuo con agitación en donde fue evaluada la producción de etanol a lo largo del tiempo mediante el método de Winnick o Microdifusión. Este proceso fue modelado con la ecuación de Gompertz modificado, la cual describe la producción de bioetanol. Los parámetros óptimos de operación fueron: 35 °C, pH de 4 y concentración de levadura de 3 g/L, con una duración del experimento de 59 horas. Los parámetros de la ecuación de Gompertz modificado con los que se trabajó fueron: tiempo lag de 2h, concentración máxima de bioetanol de 22,0608 g/L y r_{pm} de 1,2998 g/L*h. El factor de correlación calculado entre los datos experimentales y modelados para el modelo de Gompertz modificado fue de $R^2=0,8842$.

Palabra claves: Mucílago de cacao, Fermentación alcohólica, Optimización, Etanol, Tasa máxima de producción de Bioetanol, Modelo matemático.

ABSTRACT

Cocoa mucilage is a waste of the cocoa industry that due to its content of sugars can be used as raw material in fermentative processes for the production of bioethanol. The objective of this research is to develop the mathematical model of the modified Gompertz equation to predict the production of bioethanol generated in the fermentation of cocoa mucilage CCN-51 with yeast of the *Saccharomyces cerevisiae* type, under optimal conditions of operation (pH, temperature, yeast concentration). The optimization was carried out by means of a complete factorial design 2^3 (two levels and three variables: temperature, pH and yeast concentration). The fermentation was carried out in a discontinuous bioreactor with stirring, where the production of ethanol was evaluated over time using the Winnick or Microdiffusion method. This process was modeled with the modified Gompertz equation, which describes the production of bioethanol. The optimal operating parameters were: 35 °C, pH of 4 and yeast concentration of 3 g/L, with a duration of the experiment of 59 hours. The parameters of the modified Gompertz equation with which we worked were: lag time of 2h, maximum bioethanol concentration of 22.0608 g/L and r_{pm} of 1.2998 g/L*h. The correlation factor calculated between the experimental and modeled data for the modified Gompertz model was $R^2 = 0.8842$.

Keywords: Cocoa mucilage, Alcoholic fermentation, Optimization, Ethanol, Maximum production rate of Bioethanol, Mathematical Model

ÍNDICE GENERAL

RESUMEN	2
ABSTRACT	3
CLÁUSULA DE LICENCIA Y AUTORIZACIÓN PARA PUBLICACIÓN EN EL REPOSITORIO INSTITUCIONAL	11
CLÁUSULA DE PROPIEDAD INTELECTUAL	12
DEDICATORIA	12
AGRADECIMIENTO	14
CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN	15
1.1 Objetivos generales y específicos.	17
1.1.1. Objetivo general.....	17
1.1.2. Objetivos específicos	17
CAPÍTULO 2. CONTENIDO TEÓRICO	18
2.1. Generalidades del cacao	18
2.1.1. Producción del cacao en Ecuador	18
2.1.2. Tipos de cacao.	19
2.1.2.1. <i>Cacao forastero</i>	19
2.1.2.2. <i>Cacao Criollo</i>	19
2.1.2.3. <i>Cacao trinitario</i>	19
2.1.3. Cacao CCN-51.	19
2.1.4. Definición del mucílago de cacao	20
2.1.5. Propiedades físico-químico del mucílago de cacao	20
2.2. FERMENTACIÓN ALCOHÓLICA	20
2.2.1. Bioquímica de la reacción	21
2.2.2. Levadura	22
2.2.3. Clasificación de las levaduras	22
2.2.3.1. <i>Saccharomyces Cerevisiae</i>	23
2.2.4. Parámetros necesarios en la fermentación alcohólica	24
2.2.4.1. <i>Temperatura</i>	24
2.2.4.2. <i>Oxígeno</i>	24
2.2.4.3. <i>pH</i>	24
2.2.4.4. <i>Concentraciones de alcohol</i>	25
2.2.4.5. <i>Concentración de sustrato</i>	25
2.2.4.6. <i>Agitación</i>	25
2.2.4.7. <i>Nutrientes</i>	25
2.3. ETANOL	25

2.3.1. Materias primas utilizadas en la producción de bioetanol	26
2.3.2. Bioetanol como combustible.....	26
2.3.3. Propiedades de Bioetanol como aditivo en gasolinas	27
2.3.4. Métodos de cuantificación de Bioetanol.....	28
2.3.4.1. <i>Determinación de etanol mediante método de Winnick o microdifusión</i>	28
2.3.4.2. <i>Determinación de etanol mediante espectrofotometría enzimática.....</i>	28
2.3.4.3. <i>Determinación de etanol mediante cromatografía de gases.....</i>	29
2.4. CINÉTICA DE FERMENTACIÓN.....	29
2.4.1. Crecimiento de levaduras.....	29
2.5. MODELADO MATEMATICO.....	30
2.5.1. Modelo Logístico	31
2.5.2. Modelo de Gompertz	32
2.5.3. Modelo de Gompertz modificado.....	32
CAPÍTULO 3. METODOLOGÍA	34
3.1. LOCALIZACION DEL ESTUDIO	34
3.2. MATERIA PRIMA	34
3.2.1. (Sustrato) Mucílago de Cacao CCN-51	34
3.2.2. (Fermento) Levadura.....	35
3.3. MÉTODO DE EXTRACCIÓN DEL MUCÍLAGO DE CACAO CCN-51	35
3.4. MÉTODO PARA LA OPTIMIZACION DE CONDICIONES DE FERMENTACION	36
3.4.1. Matriz de Diseño Experimental.....	36
3.4.2. Cuantificación del bioetanol.....	37
3.4.3. Determinación de los efectos de las variables	38
3.4.4. Determinación de los parámetros óptimos de operación	39
3.4.5. Descripción del proceso de fermentación alcohólica	39
3.5. MÉTODO PARA CUANTIFICACION DE BIOETANOL PRODUCIDO.....	40
3.5.1. Determinación de bioetanol mediante método de Winnick o microdifusión .41	
3.5.1.1 <i>Técnica Utilizada.....</i>	41
3.5.1.2 <i>Fundamento.....</i>	41
3.5.1.3 <i>Características del método</i>	42
3.5.1.4 <i>Condiciones ambientales requeridas</i>	42
3.5.1.5 <i>Equipos y materiales.....</i>	43
3.5.1.6 <i>Procedimiento.....</i>	43
3.5.1.7 <i>Recolección y procesamiento de datos.....</i>	44
3.6. DETERMINACIÓN PARÁMETROS DE LA ECUACIÓN DE GOMPERTZ MODIFICADO.....	44

3.6.1. Determinación del tiempo lag o tiempo de latencia.....	45
3.6.2. Determinación de producción máxima de bioetanol	45
3.6.3. Determinación de velocidad máxima de producción de bioetanol.....	45
3.6.3.1 Rutina “Método de mínimos cuadrados no lineales de Levenberg- Marquardt”.....	46
3.7. DETERMINACIÓN DE COEFICIENTES DE CORRELACIÓN	47
CAPÍTULO 4. ANÁLISIS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS	48
4.1. OPTIMIZACIÓN DE CONDICIONES DE OPERACIÓN EN LA FERMENTACIÓN ALCOHÓLICA	48
4.1.1. Resultados cuantificación de concentración de bioetanol en la muestra del diseño experimental	48
4.1.2. Analisis del diseño experimental.....	49
4.1.2.1 Estadístico P.....	49
4.1.2.2 Diagrama de Pareto.....	50
4.1.2.3 Coeficientes de relación para la concentración de bioetanol.....	51
4.1.2.4 Interacción entre variables	51
4.1.3. Parámetros óptimos de operación	52
4.1.4. Analisis de resultados del experimento 6.....	53
4.2. MODELADO DE LA ECUACION DE GOMPERTZ MODIFICADO	55
4.2.1. Curva ajustada con al modelo de la ecuación de Gompertz modificado Experimento 6.....	55
4.2.2. Resultados velocidad máxima de producción de bioetanol r_{pm} (g/L*h)	56
4.2.3. Resultados Coeficientes de correlación.....	57
CAPÍTULO 5. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	59
5.1. CONCLUSIONES	59
5.2. RECOMENDACIONES	60
REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	61
ANEXOS.....	65
Anexo 1 Ubicación geográfica de la zona de cosecha de cacao CCN-51	65
Anexo 2 Preparación de reactivos.	66
Anexo 3 Flujo grama método de mínimos cuadrados no lineales de Levenberg- Marquardt.	68
Anexo 4 Resultados experimentales y del modelado Experimento 1.	69
Anexo 5 Resultados experimentales y del modelado Experimento 2.	70
Anexo 6 Resultados experimentales y del modelado Experimento 3.	71
Anexo 7 Resultados experimentales y del modelado Experimento 4.	72
Anexo 8 Resultados experimentales y del modelado Experimento 5.	73
Anexo 9 Resultados experimentales y del modelado Experimento 6.	74
Anexo 10 Resultados experimentales y del modelado Experimento 7.	75

<i>Anexo 11 Resultados experimentales y del modelado Experimento 8.</i>	<i>76</i>
<i>Anexo 12 Resultados experimentales y del modelado Experimento 9-1.</i>	<i>77</i>
<i>Anexo 13 Resultados experimentales y del modelado Experimento 9-2.</i>	<i>78</i>
<i>Anexo 14 Fotografías de la investigación.....</i>	<i>79</i>

ÍNDICE DE ECUACIONES

Ecuación 1 Ecuación de Gay Lussac - Fermentación Alcohólica.....	21
Ecuación 2 Ecuación logística en forma diferencial.....	31
Ecuación 3 Ecuación Logística Integrada.....	31
Ecuación 4 Ecuación de Gompertz.....	32
Ecuación 5 Ecuación de Gompertz modificada.....	33
Ecuación 6 Reacción Oxido-Reducción método de Winnick.....	41
Ecuación 7 Reacción de liberación de Yodo.....	41
Ecuación 8 Reacción de titulación de Yodo liberado.....	42
Ecuación 9 Calculo de bioetanol en g/L.....	44
Ecuación 5 Ecuación de Gompertz modificada.....	45
Ecuación 10 Ecuación para el cálculo de la productividad del proceso fermentativo..	48
Ecuación 11 Ecuación polinomial resultados concentración de bioetanol.....	51

ÍNDICE DE ILUSTRACIONES

Ilustración 1 Principales productores de bioetanol en Ecuador.....	16
Ilustración 2 Distribución de plantaciones de cacao en Ecuador.....	18
Ilustración 3 Esquema de la transformación de glucosa en etanol (vía Embden-Meyerhof-Parnas).....	22
Ilustración 4 Esquema de obtención de cacao CCN-51 y extracción de mucílago.....	35
Ilustración 5 Esquema de pretratamiento de muestra y determinación de bioetanol por método de Winnick.....	38
Ilustración 6 Esquema de proceso de fermentación alcohólica.....	40
Ilustración 7 Script de la rutina "Método de mínimos cuadrados no lineales de Levenberg-Marquardt" en MATLAB R2014a (ajuste_rpm.m).....	46
Ilustración 8 Script de la rutina "Método de mínimos cuadrados no lineales de Levenberg-Marquardt" en MATLAB R2014a (gompertz.m).....	46
Ilustración 9 Script de la rutina "Método de mínimos cuadrados no lineales de Levenberg-Marquardt" en MATLAB R2014a (gompertz.m).....	46
Ilustración 10 Diagrama de Pareto de los efectos principales a un nivel de confianza del 95%.....	50
Ilustración 11 Producción de bioetanol durante la fermentación alcohólica (Experimento 6 de la matriz experimental).....	54
Ilustración 12 Resultados experimentales y modelado de la ecuación de Gompertz modificado experimento 6.....	56
Ilustración 13 Flujograma método de mínimos cuadrados no lineales de Levenberg-Marquardt.....	68
Ilustración 14 Resultados experimentales y modelado de la ecuación de Gompertz modificado experimento 1.....	69
Ilustración 15 Resultados experimentales y modelado de la ecuación de Gompertz modificado. Experimento 2.....	70
Ilustración 16 Resultados experimentales y modelado de la ecuación de Gompertz modificado experimento 3.....	71
Ilustración 17 Resultados experimentales y modelado de la ecuación de Gompertz modificado experimento 4.....	72
Ilustración 18 Resultados experimentales y modelado de la ecuación de Gompertz modificado experimento 5.....	73

Ilustración 19 Resultados experimentales y modelado de la ecuación de Gompertz modificado experimento 6.....	74
Ilustración 20 Resultados experimentales y modelado de la ecuación de Gompertz modificado experimento 7.....	75
Ilustración 21 Resultados experimentales y modelado de la ecuación de Gompertz modificado experimento 8.....	76
Ilustración 22 Resultados experimentales y modelado de la ecuación de Gompertz modificado experimento 9-1.....	77
Ilustración 23 Resultados experimentales y modelado de la ecuación de Gompertz modificado experimento 9-2.....	78

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1 Características físico-químicas mucílago de cacao CCN-51.....	20
Tabla 2 Taxonomía de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	23
Tabla 3 Propiedades de la gasolina y del bioetanol.....	26
Tabla 4 Propiedades de la gasolina y del bioetanol.....	27
Tabla 5 Requisitos del etanol anhidro grado carburante.....	28
Tabla 6 Identificación de variables y niveles para el diseño experimental.....	36
Tabla 7 Matriz de diseño experimental 2 ³	37
Tabla 8 Equipos y materiales Método de Winnick.....	43
Tabla 9 Resultados de la concentración máxima de bioetanol en los experimentos..	49
Tabla 10 Valores del estadístico P.....	50
Tabla 11 Resultado de los efectos. Temperatura (X1), pH (X2), Concentración de levadura (X3).....	51
Tabla 12 Resultados de parámetros óptimos para maximizar la producción de bioetanol.....	52
Tabla 13 Resultados obtenidos en la titulación del método de Winnick para determinación de bioetanol en el experimento 6.....	53
Tabla 14 Resultados de la concentración de bioetanol del experimento 6.....	54
Tabla 15 Comparación de resultados (experimentales – modelados) experimento 6..	55
Tabla 16 Resultados del valor ajustado de la velocidad máxima de producción de bioetanol r_{pm}	56
Tabla 17 Resultados del valor de R^2 en el modelado en MATLAB R2014a de la ecuación de Gompertz modificado.....	57
Tabla 18 Valores de R^2 del modelado de la ecuación de Gompertz modificado para la producción de etanol a partir de distintos sustratos.....	58
Tabla 19 Resultados experimento 1.....	69
Tabla 20 Resultados modelado en MATLAB R2014a ecuación de Gompertz modificado experimento 1.....	69
Tabla 21 Resultados del experimento 2.....	70
Tabla 22 Resultados modelado en MATLAB R2014a ecuación de Gompertz modificado experimento 2.....	70
Tabla 23 Resultados del experimento 3.....	71
Tabla 24 Resultados modelado en MATLAB R2014a ecuación de Gompertz modificado experimento 3.....	71
Tabla 25 Resultados experimento 4.....	72
Tabla 26 Resultados modelado en MATLAB R2014a ecuación de Gompertz modificado experimento 4.....	72

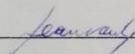
Tabla 27 Resultados experimento 5.....	73
Tabla 28 Resultados modelado en MATLAB R2014a ecuación de Gompertz modificado experimento 5.....	73
Tabla 29 Resultados experimento 6.....	74
Tabla 30 Resultados modelado en MATLAB R2014a ecuación de Gompertz modificado experimento 6.....	74
Tabla 31 Resultados experimento 7.....	75
Tabla 32 Resultados modelado en MATLAB R2014a ecuación de Gompertz modificado experimento 7.....	75
Tabla 33 Resultados experimento 8.....	76
Tabla 34 Resultados modelado en MATLAB R2014a ecuación de Gompertz modificado experimento 8.....	76
Tabla 35 Resultados experimento 9-1.....	77
Tabla 36 Resultados modelado en MATLAB R2014a ecuación de Gompertz modificado experimento 9-1.....	77
Tabla 37 Resultados experimento 9-2.....	78
Tabla 38 Resultados modelado en MATLAB R2014a ecuación de Gompertz modificado experimento 9-2.....	78

Cláusula de licencia y autorización para publicación en el Repositorio Institucional

Jean Carlo Orellana Valarezo en calidad de autor/a y titular de los derechos morales y patrimoniales del trabajo de titulación "Modelado de la ecuación de Gompertz modificado para la producción de bioetanol en procesos fermentativos dentro de un reactor tipo batch a partir de mucílago de cacao CCN-51". Caso Ecuador – Zona 6 de conformidad con el Art. 114 del CÓDIGO ORGÁNICO DE LA ECONOMÍA SOCIAL DE LOS CONOCIMIENTOS, CREATIVIDAD E INNOVACIÓN reconozco a favor de la Universidad de Cuenca una licencia gratuita, intransferible y no exclusiva para el uso no comercial de la obra, con fines estrictamente académicos.

Asimismo, autorizo a la Universidad de Cuenca para que realice la publicación de este trabajo de titulación en el repositorio institucional, de conformidad a lo dispuesto en el Art. 144 de la Ley Orgánica de Educación Superior.

Cuenca, 23 de mayo de 2018



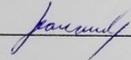
Jean Carlo Orellana Valarezo

C.I: 0706627338

Cláusula de Propiedad Intelectual

Jean Carlo Orellana Valarezo, autor del trabajo de titulación "Modelado de la ecuación de Gompertz modificado para la producción de bioetanol en procesos fermentativos dentro de un reactor tipo batch a partir de mucilago de cacao CCN-51". Caso Ecuador – Zona 6, certifico que todas las ideas, opiniones y contenidos expuestos en la presente investigación son de exclusiva responsabilidad de su autor/a.

Cuenca, 23 de mayo de 2018



Jean Carlo Orellana Valarezo

C.I: 0706627338

DEDICATORIA

“Este es el punto final de años de preparación académica, el inicio de una vida profesional y una etapa crucial de mi vida”.

Este logro de mi vida fue posible gracias a mis padres, un par de personas como ninguna, apoyando con ciega confianza a una persona que les ha dado tan poco.

A ustedes y cada una de las personas que se han cruzado en mi camino, todos ustedes lograron que sea la persona que soy en este momento.

AGRADECIMIENTO

De manera sincera y humilde agradezco a todo el personal de la Universidad de Cuenca que permitió, gracias a su amable y eficaz apoyo, lograr este trabajo de investigación.

A mis compañeros de experimentación Marco y Jessica por su paciencia y entrega durante estos meses.

A mi tutor de tesis Jorge por su calma, dedicación y preocupación. Cualidades esenciales en un educador que fueron un pilar de todo este proceso.



CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN

Hay varias razones por las que la región de América Latina tiene un mayor potencial para producir biocombustibles, siendo estas, su clima estable y baja densidad poblacional, comparada con otros países productores de bioetanol precursores en esta industria. Según Toala, Astudillo, & Tobalina (2009) Brasil y EE.UU producen el 80% de la oferta mundial de etanol. Una clara ventaja de la región de América Latina es que para producir la misma cantidad de etanol se requiere menor área de cultivo, por ejemplo en EE.UU se necesita el doble de área de cultivo de maíz que Brasil con caña de azúcar.

Uno de los factores más importantes que afectan directamente el rendimiento de la producción de bioetanol es el contenido de azúcares de la materia prima, de acuerdo a esto, el mayor rendimiento se da al fermentar sustancias con contenido de azúcares (como la caña de azúcar, remolacha azucarera, mucílago de cacao), el rendimiento disminuye a un nivel intermedio para sustancias que contienen almidón (como el maíz, yuca), y el menor rendimiento es para las celulosas. Dentro de las posibles materias primas para la obtención de etanol considerando el contenido de azúcares se encuentra el mucílago de Cacao CCN-51 (17° Brix aprox.). (Quizhpi, 2016; Toala et al., 2009)

Uno de los atributos más investigados del etanol, es su utilidad como un recurso energético renovable, lo que disminuye la dependencia del petróleo como combustible, además es energéticamente eficaz, ya que se puede aprovechar el triple de la energía necesaria para producirlo y transportarlo. El uso de este compuesto como combustible es un avance tecnológico ya que en comparación a los combustibles fósiles este produce menos contaminantes al medio ambiente; de acuerdo al Departamento de Energía de EE.UU. el etanol emite en menor cantidad el monóxido de carbono e hidrocarburos, en comparación con la gasolina común, reduciendo cuantitativamente un 85% de emisión de gases de efecto invernadero. (Toala et al., 2009)

El bioetanol mezclado con gasolina (máximo 15% de bioetanol) puede ser utilizado como combustible directamente, tomando el nombre de "gasohol", ("Ecopais" con 5% de bioetanol en Ecuador) sin tener que realizar alguna modificación al motor. También puede ser usado en estado puro en automóviles diseñados para este combustible. El bioetanol químicamente provee más oxígeno a la mezcla combustible dando una mejora a la eficiencia en la reacción de combustión debido a la interacción de este átomo de oxígeno extra que hay por cada molécula. Se ha confirmado que en motores de combustión interna el uso de combustibles oxigenados de manera general

reduce la emisión de hidrocarburos totales y monóxido de carbono (CO) en escenarios estándar de temperatura. Existen otras alternativas para el uso del bioetanol como combustible, la cual es transformarlo en un aditivo oxigenante de la gasolina común, como el tercbutil alcohol (TBA) o el etil-tercbutil éter (ETBE) el cual se está imponiendo entre los demás por emitir menos sustancias tóxicas al medio ambiente. Estos aditivos oxigenantes sirven para incrementar el octanaje original del combustible y mermar emisiones contaminantes. (Gracia, 2004; Melo, Sánchez, Ferrer, & Ferrer, 2012)

En el Ecuador el parque automotriz, de la forma que opera, puede emplear la mezcla de gasolina hasta con un 10% de bioetanol, sin embargo la mezcla que se comercializa con el nombre de “Ecopais” contiene solo 5 % de bioetanol. Además de esto el bioetanol es un combustible en motores de combustión interna (avionetas, lanchas, maquinaria agroindustrial, generación eléctrica). Ecuador como país genera 157.000 litros de alcohol por día, cuyo uso es destinado para bebidas alcohólicas mayoritariamente. La producción de bioetanol por parte de la empresa privada, está en las manos de estas tres fábricas, como se muestra en ilustración 1: Producargo, asociada al Ingenio La Troncal (75 mil L/día); Codana S.A., asociada al Ingenio Valdez (50 mil L/día), y Soderal S.A., asociada al Ingenio San Carlos (32 mil L/día). El precio intermedio de bioetanol anhidro por litro en las fábricas mencionadas es de USD 0,55 por litro. Ecuador exporta alrededor del 70 y el 80% del alcohol que se obtiene. Ecuador, en el 2017 ha reportado una capacidad de producción de etanol anhidro grado carburante de 200.000 litros por día, esta cantidad sustituye el 40% de la demanda interna de gasolina extra, proyectándose a cumplir la totalidad de la demanda con el pasar de los años. (El Telégrafo, 2017; Toala et al., 2009)

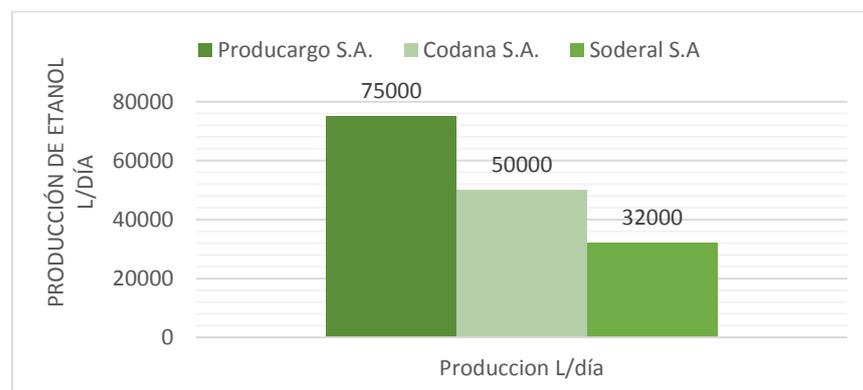


Ilustración 1 Principales productores de bioetanol en Ecuador.

Fuente: (Toala et al., 2009)

Elaboración: Autor



Para la obtención de alcohol por la vía fermentativa se requiere de un sustrato con contenido de azúcares determinado, en este caso el mucílago de Cacao CCN-51, la fermentación alcohólica de este tipo de sustancias se comporta de distintas maneras teniendo en cuenta la variación de condiciones de operación, por lo cual es necesario un estudio de la fermentación, condiciones de operación y velocidad de producción de bioetanol para su mejor aprovechamiento como recurso energético renovable.

En el año 2014 el Ecuador pasó a ocupar el quinto lugar a nivel mundial en productores de cacao. Su producción neta alcanzó 240 mil toneladas métricas, de las cuales 230 mil fueron exportadas. La meta a futuro del sector cacaotero es alcanzar a exportar entre 280 a 300 mil toneladas métricas en los próximos dos años (2016). El sector está creciendo, con nuevas plantaciones o ampliaciones de las ya existentes. (Vallejo, 2014)

En la industria del cacao existen muchos desechos aprovechables, uno de los cuales es el mucílago de cacao, se ha determinado en previas investigaciones que se obtiene alrededor de 14,61 g de mucílago por kilo de mazorca, es decir se tiene aproximadamente 1,46% de mucílago en peso por mazorca, el cual puede ser aprovechado para la obtención de bioetanol. (Quizhpi, 2016)

1.1 Objetivos generales y específicos.

1.1.1. Objetivo general

Modelar de la ecuación de Gompertz modificada para la producción de bioetanol a partir de la fermentación de mucilago de cacao CCN-51.

1.1.2. Objetivos específicos

- Determinar las condiciones óptimas de operación para maximizar producción de bioetanol.
- Estandarizar el método analítico Winnick o Microdifusión para la determinación de bioetanol en la fermentación de mucilago de cacao CCN-51.
- Determinar la velocidad de producción de bioetanol a diferentes condiciones de operación del biorreactor mediante un ajuste con métodos numéricos.
- Definir el modelo de Gompertz modificado al experimento de mayor producción de bioetanol.

CAPÍTULO 2. CONTENIDO TEÓRICO

2.1. Generalidades del cacao

El cacao es cultivado en zonas donde la temperatura varía de 20 a 24 °C, para su correcto crecimiento requiere de humedad durante todo el año y que la temperatura no descienda menos de 15 °C. El cacao es de la familia de las *Esterculiáceas*. De la especie *Theobroma cacao* L. Es una planta común de las zonas amazónicas de América. (García & Edilma, 2014)

La planta de cacao es de tamaño mediano (5 a 8 m), que crece de acuerdo a las condiciones ambientales, hasta 20 m si tiene suficiente sombra, con raíces que penetran 30 cm el suelo, con hojas de color variado (café claro, morado, rojizo, verde pálido), sus flores son pequeñas que se producen de la misma manera que los frutos. El fruto, por lo general llamado mazorca tiene un tamaño, forma y color que varía dependiendo del tipo de cacao y ambiente en el que crece, habitualmente tiene una pared gruesa, con una pulpa blanca (mucílago) de sabor ácido, dulce y aromático. La mazorca usualmente contiene de 20 a 60 semillas de color café o morado de sabor dulce o amargo. (Arciniegas Leal, 2005; García & Edilma, 2014)

2.1.1. Producción del cacao en Ecuador

Las plantaciones de cacao se extienden por todo el país, como se ve en la ilustración 2 las cosechas se concentran en la región costa especialmente en las provincias de Guayas y Los Ríos. Según datos oficiales del INEC en el 2016 la producción neta de cacao (Almendra seca) alcanzó los 177551,29 Tm. (INEC, 2016)

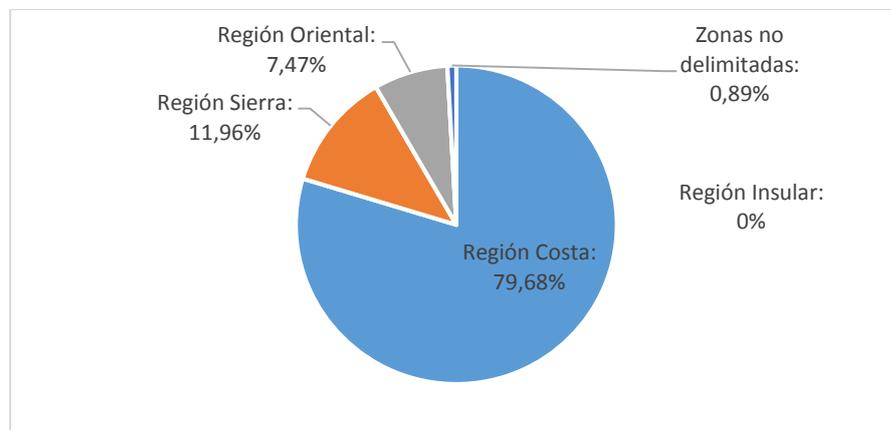


Ilustración 2 Distribución de plantaciones de cacao en Ecuador.

Fuente: (INEC, 2016)

Elaboración: Autor.



2.1.2. Tipos de cacao.

El género *Theobroma cacao* es el más común en los cultivos del mundo, del cual se distinguen 3 tipos:

- Forastero
- Criollo
- Trinitario.

2.1.2.1. Cacao forastero.

Los Forasteros representan más del 80% de cultivos de cacao en el mundo, su origen es la Amazonía de Sudamérica. Este tipo de cacao tiene la característica de mazorcas de cascara leñosa y dura, granos de forma aplanada de color morado y un sabor amargo. Para este tipo de cacao resaltan variedades como: Cundeamor, Sambito, Amelonado, Calabacillo y Angoleta. Dentro de este tipo de cacao, se encuentra la variedad Nacional originaria de Ecuador que se identifica por ser un cacao fino de gran aroma. (Arciniegas Leal, 2005)

2.1.2.2. Cacao Criollo.

Los Criollos o también conocidos como híbridos de cacao dulce, son nativos de Sudamérica donde se cultivan, además de las zonas de Centro América y México donde fueron domesticados, Este tipo de cacao se identifica por presentar mazorcas de cascara suave, granos de forma redonda de color blanco a violeta y un sabor agradable y dulzón. Este tipo de cacao es más susceptible a enfermedades. (Arciniegas Leal, 2005)

2.1.2.3. Cacao trinitario.

Los cacaos Trinitarios ocupan el 15 % de la producción mundial, se originaron en el Caribe a partir de hibridación natural entre un genotipo Forastero amelonado del Brasil y un genotipo Criollo que se presenta comúnmente en Granada, Trinidad y Tobago y Jamaica, debido a esto presenta morfología y caracteres genéticos de ambos tipos. Este tipo de cacao presenta granos medianos a grandes con cotiledones castaños. (Arciniegas Leal, 2005)

2.1.3. Cacao CCN-51.

Desde los inicios de Ecuador como país cacaotero la producción de cacao (*Theobroma cacao L*) ha sido de alta influencia económica. Sin embargo este tiene el problema de ser poco productivo, ya hace 30 años teniendo en cuenta este problema,

el agrónomo Homero Castro investigó y desarrolló y mediante una selección y cruzamientos con variedades trinitarias el clon CCN-51, cuyas nuevas características fueron: el ser auto compatible, una marcada tolerancia a las enfermedades y una mejora en la productividad, en contraste a las huertas tradicionales. (Vera-Chang et al., 2016)

2.1.4. Definición del mucílago de cacao

Dentro de la mazorca de cacao las semillas se encuentran suspendidas por las venas en una pulpa blanca de carácter aromático. Esta pulpa llamada comúnmente mucílago está compuesto por células esponjosas parenquimatosas, que contienen células de savia ricas en azúcares (10 - 13%), pentosas (2 - 3%), ácido cítrico (1 - 2%), y sales (8 - 10%). (Kalvatchev, Garzaro, & Guerra, 1998)

2.1.5. Propiedades físico-químico del mucílago de cacao

En la siguiente tabla se detallan las propiedades físico-químicas del mucílago de cacao CCN-51, este estudio presenta los resultados.

Tabla 1 Características físico-químicas mucílago de cacao CCN-51.

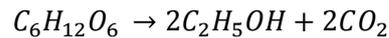
Características físico-químico	
Parámetro	Concentración
Total de sólidos solubles (° Brix)	17,15 ± 0,86
pH	4,05 ± 0,004
Acidez titulable (meq/L)	245,25 ± 21,19
Azúcares reductores totales (%)	12,56 ± 1,71
Azúcares totales (%)	62,95
Densidad (g/ml)	1,06
Calcio (mg/L)	169,21 ± 31,04
Sodio (mg/L)	161,85 ± 40,41
Potasio (mg/L)	462,9 ± 49,96

Fuente: (Quizhpi, 2016)

Elaboración: Autor

2.2. FERMENTACIÓN ALCOHÓLICA

La producción de bioetanol inicia fundamentalmente con la degradación de azúcares en alcohol y dióxido de carbono mediante la acción de ciertos microorganismos, esta reacción toma el nombre de fermentación alcohólica y se representa mediante la siguiente ecuación:



Ecuación 1 Ecuación de Gay Lussac - Fermentación Alcohólica

El microorganismo más usado para que se de esta reacción es la levadura *Saccharomyces cerevisiae*, que transforma los azúcares consumibles en etanol, en ausencia de O_2 , lo cual genera por cada mol de azúcar reductor, 2 moles de adenosín trifosfato (ATP) (nucleótido fundamental en la obtención de energía celular) y 2 moles de etanol. Adicional a la *Saccharomyces cerevisiae* existen demás microorganismos capaces de producir la fermentación alcohólica, como es el caso de levaduras como *Pichia stipitis*, *Candida shehatae* y *Pachysolen tannophilus*, sin embargo su tasa de producción de etanol es al menos 5 veces menor a la observada para *Saccharomyces cerevisiae*. En el caso de bacterias, se ha usado *Zymomonas mobilis*, pero el uso industrial de estas es muy bajo. (Sánchez & Cardona, 2005; Vázquez & Dacosta, 2007).

El uso de microorganismos genéticamente modificados (GM) en la industria del alcohol es determinado por la característica que se busca mejorar de la cepa original, en especial se busca mejorar la cepa de la *Saccharomyces cerevisiae* y se ha logrado un aumento significativo en la productividad y resistencia del microorganismo a múltiples procesos de fermentación, sin embargo el estudio genético se expandió a las no-*Saccharomyces*, que aunque no igualan en rendimiento, mejoran determinadas características enológicas y tienen una elevada resistencia al estrés. (Schuller & Casal, 2006)

2.2.1. Bioquímica de la reacción

Describiendo la bioreacción de fermentación alcohólica en un principio las hexosas (azúcares fermentables) producen ácido pirúvico mediante la glucólisis (via Embden-Meyerhof-Parnas), para esto se necesita de las enzimas que proveen el microorganismo fermentador (*Saccharomyces cerevisiae*). El ácido pirúvico se descarboxilará produciendo dióxido de carbono y acetaldehído. Finalmente debido a la acción de la enzima deshidrogenasa, el acetaldehído se convierte en etanol. (Vázquez & Dacosta, 2007)

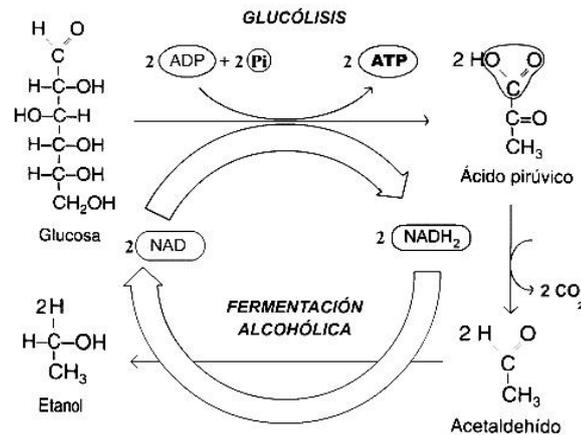


Ilustración 3 Esquema de la transformación de glucosa en etanol (vía Embden-Meyerhof-Parnas).

Fuente: (Vázquez & Dacosta, 2007)

Elaboración: (Vázquez & Dacosta, 2007)

2.2.2. Levadura

El nombre levadura agrupa una amplia gama de microorganismos unicelulares, dentro de las cuales existen tanto especies patógenas, como especies inocuas de gran utilidad para la industria. Estos organismos fueron descubiertos en el siglo XIX por el francés Louis Pasteur, desde la antigüedad han sido usadas para la elaboración de sustancias con contenido de alcohol. Al pasar de los años se han diferenciado distintas cepas las cuales tienen distintos usos y comportamiento. (Suárez, Garrido, & Guevara, 2016)

Estos microorganismos presentan un núcleo definido por una membrana, se distinguen entre sí debido a su tamaño, forma y color. Son considerados una especie de hongos unicelulares que presentan con más frecuencia una forma ovalada. Su reproducción se da por gemación, su diámetro máximo alcanza los 4 - 5 μm . En general toleran pH dentro del rango de 3 a 10 pero un pH entre 4,5 a 6,5 las favorece. Se ha estudiado por completo su genoma, lo que permite la revisión y manipulación genética, con el fin de crear cepas direccionadas a condiciones de vida y al producto buscado. (Suárez et al., 2016)

2.2.3. Clasificación de las levaduras

Su clasificación es un tema a discusión debido a que existen diversos criterios para hacerlo, dentro de las casi 500 especies de levaduras las de mayor interés estudio son las del género *Saccharomyces*, Según Mesas y Alegre (1999) de acuerdo a su forma se clasifican en:



Saccharomyces cerevisiae: forma redondeada

Saccharomyces elípticoideus: forma de elipse

Saccharomyces apiculatus: forma de limones

Saccharomyces uvarum: forma de salchichas

Otro criterio que exponen Mesas y Alegre (1999) es clasificar a las levaduras de acuerdo a sus características bioquímicas. Entre las cuales tenemos:

- Azúcares que son capaces de fermentar.
- El rendimiento en alcohol, es decir la cantidad de azúcar que necesitan para producir 1 grado de alcohol.
- Su poder alcohológeno, que es la máxima concentración de etanol que pueden tolerar antes de inhibirse.
- Subproductos que generan durante la fermentación.
- Resistencia que tiene al anhídrido sulfuroso.
- Capacidad de asimilación de sustancias nitrogenadas.

2.2.3.1. *Saccharomyces Cerevisiae*

La *Saccharomyces cerevisiae* es un microorganismo de gran importancia para la Humanidad debido a los productos que esta permite obtener, su etimología viene de Saccharo (azúcar), myces (hongo) y cerevisiae (cerveza). Se la caracteriza como levadura heterótrofa, es decir tiene una alta capacidad fermentativa y obtiene energía bioquímica a partir de hexosas. Utiliza preferentemente monosacáridos (glucosa, fructosa, manosa y galactosa) y disacáridos (maltosa e isomaltosa) como fuente de carbono y de energía. Esta especie de microorganismo está definido como GRAS, es decir es permitido usarla como aditivo alimentario. (Suárez et al., 2016)

Tabla 2 Taxonomía de *Saccharomyces cerevisiae*.

Taxonomía	
Reino	Fungi
División	Ascomycota
Clase	Hemiascomycetes
Orden	Saccharomycetales
Familia	Saccharomycetaceae
Género	Saccharomyces
Especie	S. cerevisiae

Fuente: (López, 2017)

Elaboración: Autor.



2.2.4. Parámetros necesarios en la fermentación alcohólica

En la industria habitualmente se produce el bioetanol por fermentación alcohólica en reactores discontinuos. En general el rendimiento de esta reacción es del 90% del máximo teórico. El 10 % restante subproducto de la reacción genera biomasa y otros metabolitos. En la práctica este rendimiento no siempre se alcanza puesto que se ve condicionado por parámetros de operación como: Temperatura, Oxígeno presente en el ambiente, Concentración de sustrato, pH, Concentración de bioetanol y Nutrientes. (Sánchez & Cardona, 2005)

2.2.4.1. Temperatura.

La temperatura de operación afecta directamente la capacidad de desdoblar los azúcares fermentables y el crecimiento celular. Las levaduras son microorganismos mesófilos, es decir su temperatura no puede exceder los 50 °C por más de 5 min ya que provocaría su muerte, hay que considerar que la fermentación alcohólica es un proceso que libera calor, por lo tanto es necesario un sistema de enfriamiento que controle este parámetro, el valor óptimo para fermentaciones anaerobias es de 30 °C, de esta manera se incrementa el rendimiento de la reacción. (Durango Londoño, 2007; Garzón Castaño & Hernandez Londoño, 2009)

2.2.4.2. Oxígeno

La fermentación alcohólica por parte de la *Saccharomyces cerevisiae* necesita de un ambiente anaerobio para producir bioetanol, es decir producir energía. En presencia de oxígeno se produce muy poco o nada de bioetanol debido a la inhibición de la reacción. Esta limitación se conoce como *efecto Pasteur*. (Martín Barry, 2005)

2.2.4.3. pH

Dentro de los factores que limitan la fermentación alcohólica el pH es uno de los más importantes, debido a que influye directamente en el desarrollo celular de la levadura, en el transcurso de la reacción el pH del medio tiende a disminuir ya que se producen ácidos a partir de los aminoácidos presentes, en la industria de producción de alcohol generalmente se regula el pH para generar la mayor producción de alcohol, los niveles óptimos de pH van de 3.5 hasta 5.5. (Garzón Castaño & Hernandez Londoño, 2009)



2.2.4.4. Concentraciones de alcohol

La presencia de bioetanol en el mosto tiende a inhibir el crecimiento de la levadura y reducir su viabilidad, a partir de un 8% de concentración en volumen se empieza a tener efectos adversos y luego del 14% el proceso se volverá muy lento por lo que se recomienda no llegar a concentraciones muy altas. La *Saccharomyces cerevisiae* puede llegar a soportar hasta un 20% de bioetanol. (Suárez et al., 2016; Vázquez & Dacosta, 2007)

2.2.4.5. Concentración de sustrato

La pared celular de las levaduras permiten el paso de los nutrientes y respiración normal de la levadura, pero cuando la presión osmótica es alterada, la célula tiende a tener problemas de respiración, esto se da cuando la concentración de azúcares supera el 22%. El parámetro óptimo de funcionamiento esta entre el 10 a 18% de concentración de azúcar. (Garzón Castaño & Hernandez Londoño, 2009)

2.2.4.6. Agitación

La agitación es un factor importante que disminuye la sedimentación de la levadura, de esta manera se produce un contacto más eficiente entre sustrato y microorganismos. Se recomienda realizar la fermentación alcohólica de 200 a 400 rpm. (Ferreira, Schvab, Davies, Gerard, & Hours, 2012)

2.2.4.7. Nutrientes

La fermentación alcohólica, para su desarrollo óptimo requiere una variedad de nutrientes, dentro de los cuales están: carbono, hidrogeno, nitrógeno, fósforo, azufre, potasio y magnesio, estos pueden ser propios del mosto a fermentar o adicionados al medio. Debido a esto es conveniente caracterizar la materia prima y determinar mediante técnicas de bromatología sus nutrientes. (Durango Londoño, 2007)

2.3. ETANOL

El etanol o alcohol etílico de formula $\text{CH}_3\text{-CH}_2\text{-OH}$ es un líquido incoloro, altamente inflamable que posee un punto de ebullición en torno a 78°C . Es altamente volátil. Este compuesto orgánico tiene diversas aplicaciones, además de usarse en alimentos, bebidas alcohólicas o como antiséptico, se usa en muchos y diversos sectores como en la industria: farmacéutica, cosmética, perfumería, como disolvente, anticongelante, desinfectante y actualmente como biocombustible. (Griffin, 1981)

2.3.1. Materias primas utilizadas en la producción de bioetanol

Para la producción de bioetanol la materia prima necesaria tiene que estar compuesta por formas de carbono que tengan la capacidad de transformarse en azúcares fermentables. Se distinguen 3 tipos: Azucaradas, Amiláceas y Lignocelulósicas. (Serna, Barrera, & Montiel, 2011)

Tabla 3 Propiedades de la gasolina y del bioetanol

Fuente de carbono	Cultivo	Rendimiento (L/t de cultivo)	Rendimiento (L/ha)	Costo de producción (USD/L)	País
Sacarosa	Remolacha	100	17000	0,48	Unión Europea
	Jugo de caña	70-85	6000	0,21	Brasil
	Melaza de caña	10	590	0,32	India
	Sorgo	10	730	0,23-0,37	México
Almidón	Maíz	56-90	2500-4000	0,39-0,37	Suecia
	Trigo	400	3000	0,39-0,37	Estados Unidos
Celulosa	Trigo	340	2700	0,62	Unión Europea
	Bagazo de caña	55	3850	0,8	Chile

Fuente: (Serna et al., 2011)

Elaboración: Autor

En la tabla 3 se presentan las materias primas más usadas a nivel mundial para la producción de bioetanol, siendo las azucaradas y las amiláceas las más utilizadas, debido a la fácil disponibilidad de los azúcares, por ello los principales productores de bioetanol en el mundo, han desarrollado la tecnología a partir de estas. Las materias primas que contienen lignocelulosa presentan un inconveniente, ya que al transformar la lignocelulosa en azúcares resulta más complejo y costoso.

2.3.2. Bioetanol como combustible

Para que el etanol entre en esta categoría, debe obtenerse a partir de un recurso renovable, en este caso mediante la fermentación alcohólica de biomasa a través de la acción de microorganismos, como levaduras y bacterias. El principal uso del bioetanol es como biocombustible ya que puede ser mezclado con gasolina elevando su contenido en O₂, lo cual permite aumentar el rendimiento de la reacción de combustión disminuyendo de manera cuantitativa las emisiones dañinas al medio ambiente de hidrocarburos no oxidados completamente. (Sánchez & Cardona, 2005)

**Tabla 4** Propiedades de la gasolina y del bioetanol

Parámetro	Unidad	Gasolina	Bioetanol
Poder calorífico inferior	kJ/kg	43,5	28,225
	kJ/litro	32,18	22,350
Densidad	kg/litro	0,72-0,78	0,792
Octanaje RON*	-	90-100	102-130
Octanaje MON**	-	80-92	89-96
Calor latente de vaporización	kJ/kg	330-400	842-930
Relación aire/combustible estequiométrica	-	14,5	9,0
Presión de vapor	kPa	40-65	15-17
Temperatura de ignición	°C	220	420
Solubilidad en agua	% en volumen	~0	100

*RON: *Research Octane Number* – Numero de octano de investigación.

**MON: *Motor Octane Number* – Numero de octano del motor.

Fuente: (BNDES, CGEE, CEPAL, & FAO, 2008)

Elaboración: Autor

Otra de las razones por las que el bioetanol aporta a la reducción de gases de efecto invernadero, es la disminución de emisiones de CO₂, como se ve en la tabla 4, al tener un mayor octanaje que la gasolina común, se requiere una menor cantidad de bioetanol para tener el mismo rendimiento y en consecuencia menor emisión de CO₂. (Sánchez & Cardona, 2005)

2.3.3. Propiedades de Bioetanol como aditivo en gasolinas

En el 2017 cerca del 40% de las estaciones de venta de combustibles en Ecuador vendieron gasolina con adición de bioetanol, con el nombre comercial de Ecopais. Combustible que pretende reemplazar a la gasolina extra sin modificar el precio, este biocombustible tiene una adición del 5% de bioetanol y 95% de gasolina premezclada. (Morales, 2010)

El bioetanol debe cumplir ciertos requisitos para poder ser usado como aditivo en la producción de biocombustibles, es decir tiene que caracterizarse como etanol anhidro carburante, de esta manera se garantiza la funcionabilidad del biocombustible. Estos requisitos están regidos por la norma ecuatoriana NTE INEN 2478:2009

Tabla 5 Requisitos del etanol anhidro grado carburante.

Requisitos	Unidad	Mínimo	Máximo
Contenido de Etanol	%	99,6	-
Acidez total (como ácido acético)	mg/100ml	-	3,0
Conductividad Eléctrica	μS/m	-	500
Densidad a 20°C	kg/m ³	-	791,5
Contenido de Cloruros	mg/L	-	32
Contenido de Agua	%	-	0,3
Contenido de cobre	mg/kg	-	0,1
Residuo de Evaporación	mg/100ml	-	5,0

Fuente: (INEN, 2009)

Elaboración: Autor

2.3.4. Métodos de cuantificación de Bioetanol

Estas técnicas están basadas en distintos principios Físico-Químicos y tienen como finalidad determinar el bioetanol durante el experimento.

2.3.4.1. Determinación de etanol mediante método de Winnick o microdifusión

La microdifusión de la muestra se da debido a la volatilidad del etanol, el cual es transferido en fase gaseosa de una sección a otra de una cámara cerrada, para reaccionar con el dicromato de potasio. El principio de este método se basa en la reacción de un oxidante fuerte el cual reacciona el alcohol en la atmósfera y da como resultado un compuesto coloreado, el cual puede ser determinado mediante titulación o espectrofotometría. La reacción se da cuando el dicromato de potasio en medio fuertemente ácido (ácido sulfúrico) oxida el etanol en ácido acético, debido al exceso de dicromato quedará un remanente el cual no reaccionará, este se medirá por Yodometría. Adicional a esto es necesario el uso de un agente liberador de etanol en la muestra. (Augusto & Mora, 2015)

2.3.4.2. Determinación de etanol mediante espectrofotometría enzimática

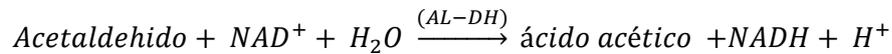
Este método se basa en dos reacciones enzimáticas, en la primera se da la oxidación del etanol a acetaldehído debido al dinucleótido nicotinamida-adenina (NAD⁺), reacción catalizada por el alcohol deshidrogenasa (ADH).



Según indica Ferrel Quispe (2011) esta es una reacción que se equilibra a favor del etanol y NAD⁺ razón por la que es necesaria una segunda reacción para captar los



productos, aquí el acetaldehído es oxidado a ácido acético en condiciones alcalinas, en presencia de aldehído deshidrogenasa (AL-DH) y NAD^+ .



Lo que se mide por este método es el NADH formado, con una longitud de onda de 340 nm, resultado que se relaciona por estequiometría con el etanol para conocer la concentración buscada. Debido a su especificidad los métodos enzimáticos para determinación de etanol son los más utilizados, ya que estos no detectan otros alcoholes y para estudios clínicos presentan una sensibilidad adecuada. (Ferrel Quispe, 2011)

2.3.4.3. Determinación de etanol mediante cromatografía de gases

Esta técnica analítica se fundamenta en la separación de compuestos, esto permite la cuantificación de los componentes de la muestra de acuerdo a la volatilidad y solubilidad propia de cada constituyente de la sustancia líquida a analizar. Es la técnica ideal para cuantificar compuestos orgánicos volátiles debido a su alta sensibilidad pero limitante a analitos que no son estables a la temperatura de volatilización requerida, puede utilizarse para compuestos cuyo punto de ebullición no supere los 400°C. En la práctica, la muestra a analizar se volatiliza y se introduce en la cabeza de una columna cromatográfica, el etanol al ser un analito estable a la temperatura de volatilización se puede determinar sin inconvenientes. De acuerdo al cromatógrafo se deberá usar un gas inerte (fase móvil) para que se produzca la elusión como He, N_2 , H_2 . La fase móvil no interacciona con la muestra ya que se usará solo con el objetivo de transportar el analito. (Narváz & Quito, 2015; Quirós, 2006)

2.4. CINÉTICA DE FERMENTACIÓN

La cinética de fermentación alcohólica se determinará de acuerdo al producto obtenido en función del tiempo, con el fin de establecer la cinética de producción de bioetanol.

2.4.1. Crecimiento de levaduras

La levadura *Saccharomyces cerevisiae* cuando se inocula en medios líquidos con glucosa como fuente de carbono demuestra un comportamiento de 5 fases de crecimiento:



Fase lag

Fase logarítmica

Fase de cambio diáuxico

Fase postdiáuxica

Fase estacionaria

La **fase lag** es un intervalo de tiempo de adaptación de la célula al entorno. La velocidad máxima de duplicación celular es alcanzada en la **fase logarítmica**, aquí es donde se produce el metabolismo fermentativo de la levadura, en condiciones anaerobias da como producto bioetanol. Después de que se ha dado el máximo nivel de metabolismo celular, la concentración de glucosa tiende a disminuir, al tener poco alimento las células disminuyen su reproducción y entran a un **cambio diáuxico**, es decir su metabolismo pasa de ser fermentativo a respiratorio. Pasada esta fase las células usan el bioetanol generado como fuente de carbono como consecuencia de esto su resistencia al estrés se incrementa, este periodo toma el nombre de **fase postdiáuxica**. Finalmente se llega a la **fase estacionaria**, aquí el nivel de nutrientes se ha agotado por lo tanto no hay reproducción celular. La pared de las levaduras se vuelven más gruesas, lo que las hace resistentes a la digestión y eleva el nivel de resistencia al estrés celular a su valor máximo. (Martín Barry, 2005)

2.5. MODELADO MATEMATICO

Un modelo matemático es una ecuación o un conjunto de ellas que tienen el objetivo de determinar el efecto que tienen las variables de entrada sobre las variables de salida en un proceso en el transcurso del tiempo. Los modelos matemáticos se realizan con el fin de predecir el comportamiento en el mundo real, sin embargo estos nunca serán una réplica exacta de la experimentación. Para que un modelo matemático sea válido la parte real debe ser semejante a la contraparte modelada, es decir, solo si se demuestra que las propiedades del modelo guardan una correspondencia adecuada con las del proceso real se tiene la razón, además de esto el modelo debe ser efectivamente verificable mediante la observación. (Coll C, Giannuzzi, Noia, & Zaritzky, 2001)

Los modelos pueden ser, de tipo empírico (describen un conjunto de datos a través de una relación matemática conveniente) o el determinístico (suministra interpretación de los parámetros en términos de fenómenos y procesos conocidos). (Jagannath & Tsuchido, 2003)

2.5.1. Modelo Logístico

Es una función matemática usada en diversos estudios de crecimiento poblacional, epidemiología y difusión de información en redes sociales. Debido a esto, este modelo matemático ha tomado interés en aplicaciones industriales de la fermentación alcohólica, campo donde se han desarrollado distintos modelos cinéticos que describen el desarrollo de microorganismos, formación de productos y consumo de sustrato. Estos estudios nos permiten predecir el rendimiento, los efectos de los factores operacionales para producir bioetanol, tales como temperatura, pH, aireación y mezclado. (Phukoetphim, Salakkam, Laopaiboon, & Laopaiboon, 2017; Ulloa & Rodríguez, 2010)

El modelo logístico fue propuesto en 1838 por el matemático belga Pierre François Verhulstcon (1804 -1849) con el objeto de describir el crecimiento poblacional, es una función sigmoidea simétrica, se puede adaptar para describir el crecimiento de microorganismos de distintos sistemas biológicos. En concreto nos permite caracterizar la variación en cantidad de organismos en función de la velocidad de crecimiento, la concentración inicial de biomasa, la máxima concentración de biomasa alcanzada, y el tiempo. Asume un sustrato suficiente en la reacción, pero no incluye la inhibición por sustrato. (Phukoetphim et al., 2017; Ulloa & Rodríguez, 2010)

La ecuación logística en la forma diferencial (Ecuación 2) se debe integrar y como resultado tenemos la (Ecuación 3), que describe mediante sus términos las fases exponencial y estacionaria del crecimiento. El modelo muestra la relación que existe debido a: la biomasa (X), la concentración inicial celular (X_0), la concentración máxima de células (X_{max}) y la tasa de crecimiento específico máximo (μ_{max}) en momentos específicos (t) durante las fases exponencial y estacionaria del crecimiento de levadura. No obstante, no predice el comportamiento después de la fase estacionaria donde se produce la muerte de los microorganismos. (Phukoetphim et al., 2017)

$$\frac{dX}{dt} = \mu_{max} \left(1 - \frac{X}{X_{max}}\right) * X$$

Ecuación 2 Ecuación logística en forma diferencial

$$X = \frac{X_0 \exp(\mu_{max} t)}{1 - \left[\left(\frac{X_0}{X_{max}}\right)(1 - \exp(\mu_{max} t))\right]}$$

Ecuación 3 Ecuación Logística Integrada

**Nomenclatura:**

X:	Concentración celular, g/L
X ₀ :	Concentración celular inicial, g/L
X _{max} :	Máxima concentración celular, g/L
μ _{max} :	Velocidad máxima de crecimiento específico, h ⁻¹
t:	Tiempo de fermentación, h

2.5.2. Modelo de Gompertz

Benjamín Gompertz (1779-1865), fue un matemático inglés miembro de la Society of Mathematicians of Spitalfields en Londres. Desde 1820 trabajó y dirigió en distintas compañías de seguros, donde conocer la probabilidad de muerte de la población en general es muy importante. Aplicando procedimientos del cálculo diferencial a cuestiones actuarias (estadística para la evaluación de riesgos) logró desarrollar el modelo matemático conocido actualmente como Ley de mortalidad de Gompertz, la cual nos muestra como los ratios de mortalidad aumentan en progresión lineal. (Kirkwood, 2015)

$$u(x) = \alpha * e^{\beta * x}$$

Ecuación 4 Ecuación de Gompertz**Nomenclatura**

u:	mortalidad a la edad x
α y β:	Constantes

La ecuación de Gompertz fue modificada por William Makeham, quien introdujo una constante que representa la mortalidad independiente a la edad, llevando esta ecuación a una escala logarítmica se obtiene una línea recta conocida como función de Gompertz cuya pendiente denota la tasa actual de envejecimiento, la cual puede ser comparada para distintas poblaciones explicando la diferencia en la longevidad de las mismas. (Kirkwood, 2015)

2.5.3. Modelo de Gompertz modificado

La función de Gompertz se utilizó inicialmente para describir la distribución de edades en la población, posteriormente se modificó y utilizó para modelar el crecimiento de microorganismos. La derivación como ecuación de predicción de crecimiento poblacional pasó a ser conocido como el “Modelo de Gompertz modificado”, el cual es una función matemática que tiene un lento inicio y final, mientras que su desarrollo intermedio es rápido. A diferencia del modelo logístico, es asimétrico. Gompertz



modificado es útil cuando se tienen crecimientos limitados por cantidad de recursos. (Kirkwood, 2015; Phukoetphim et al., 2017)

Tanto la función de Gompertz modificado, como la función logística se definen como modelos matemáticos empíricos, es decir, son de interés en situaciones prácticas y simplemente describen los datos de crecimiento bajo condiciones experimentales en forma de una conveniente relación matemática. Gompertz modificado es una función exponencial doble, que describe una curva sigmoide asimétrica. (Jagannath & Tsuchido, 2003; Phukoetphim et al., 2017)

Este modelo describe el aumento progresivo en función de la concentración máxima de biomasa, la velocidad máxima de producción de biomasa y el tiempo. La ecuación de Gompertz modificada se está utilizando cada vez más en diversos estudios, acerca de la producción de hidrógeno y bioetanol como combustibles. Para la predicción de la formación de bioetanol, este modelo presenta la concentración máxima del producto, la tasa de producción máxima y el período lag. (Phukoetphim et al., 2017)

$$P = P_{max} * exp \left\{ -exp \left[\left(\frac{r_{p,m} * exp(1)}{P_{max}} \right) * (t_l - t) + 1 \right] \right\}$$

Ecuación 5 Ecuación de Gompertz modificada

Nomenclatura:

P:	Concentración de bioetanol, g/L
P _{max} :	Concentración máxima de bioetanol, g/L
r _{pm} :	Velocidad máxima de producción de bioetanol, g/L*h
t:	Tiempo de fermentación, h
t _l :	Tiempo de Fase lag
exp(1):	Numero de Euler



CAPÍTULO 3. METODOLOGÍA

Esta investigación es de carácter exploratorio y experimental, se ha trabajado bajo condiciones recomendadas en estudios similares, pero con otra materia prima, por ende se experimentará dentro de estos rangos para obtener las condiciones óptimas de operación variando: temperatura, pH y concentración de levadura, debido a la influencia que estos presentan a el rendimiento de la producción de bioetanol y a que se requiere establecer un diseño experimental, dando como resultado los óptimos valores calculados de trabajo; Todo esto se realizó con el objetivo de obtener la máxima producción de bioetanol posible; Se cuantifico el bioetanol producido en el transcurso de la fermentación alcohólica; Se determinó y modeló la ecuación de Gompertz modificado para el experimento con las condiciones óptimas.

3.1. LOCALIZACION DEL ESTUDIO

En la etapa experimental de este proyecto de titulación, la extracción del mucílago de cacao CCN-51 se realizó en el Laboratorio de Tecnología de Alimentos, la fermentación alcohólica se efectuó en el Laboratorio de Energía e Ingeniería de la Reacción y la cuantificación del bioetanol se ejecutó en el Laboratorio de Operaciones Unitarias. Todas estas instalaciones son parte del Tecnológico de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad de Cuenca.

3.2. MATERIA PRIMA

3.2.1. (Sustrato) Mucílago de Cacao CCN-51

Se optó por esta variedad de cacao debido a su mayor productividad en comparación a las otras cultivadas en el Ecuador.

La Cosecha de Cacao se realizó en los terrenos de monocultivo de cacao de la variedad CCN-51, propiedad de J. Sigüencia ubicada vía a Zhucay, cantón La Troncal, Provincia de Cañar, Ecuador (Anexo 1), sitio que se encuentra dentro de la zona 6 del país.

Se eligió esta zona debido a la disponibilidad, facilidad de cosecha y a la existencia de un estudio previo del mucílago obtenido de cacao CCN-51 de este lugar, realizado por Quizhpi (2016) en el cual se caracterizó el mucilago de cacao CCN-51 mediante técnicas de espectrofotometría UV-VIS, espectroscopia infrarroja (FTIR).

3.2.2. (Fermento) Levadura

Para cada experimento se utilizó levadura del tipo *Saccharomyces Cerevisiae*, de marca Levapan usada comúnmente en panificación, el cual se encuentra a la venta en bloques de 500 g, producto almacenado en refrigeración (2°C) con una vida útil de 30 días.

3.3. MÉTODO DE EXTRACCIÓN DEL MUCÍLAGO DE CACAO CCN-51

La obtención del cacao CCN-51 y la posterior extracción del mucílago siguen los pasos indicados en la ilustración 4.

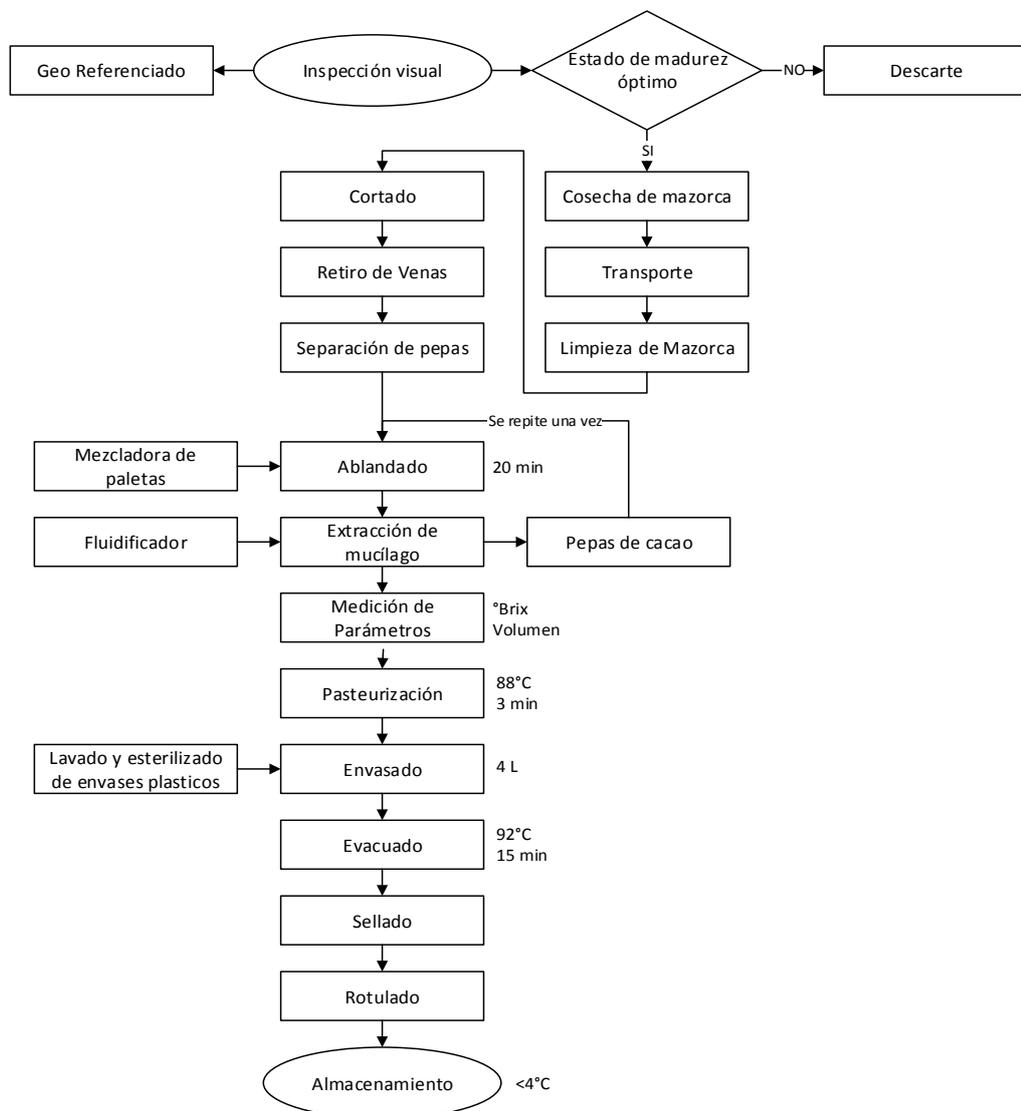


Ilustración 4 Esquema de obtención de cacao CCN-51 y extracción de mucílago.

Fuente: (Quizhpi, 2016)

Elaboración: Autor

3.4. MÉTODO PARA LA OPTIMIZACIÓN DE CONDICIONES DE FERMENTACION

Para esta investigación se variará 3 condiciones de operación: temperatura, pH y concentración de levadura, dentro de los intervalos recomendados en la investigación previa “*Determinación de la cinética de fermentación alcohólica del mucílago de Cacao CCN-51 en condiciones óptimas de operación de temperatura, pH y concentración de levadura*” realizada por Macías & Saavedra (2017) donde se aplica un diseño de matriz experimental con el fin de identificar la combinación de variables que nos da un mejor resultado.

3.4.1. Matriz de Diseño Experimental

Para determinar las condiciones óptimas de operación en la fermentación alcohólica de mucílago de cacao CCN-51 se aplicó un diseño experimental completo 2^3 , es decir 3 variables (temperatura, pH y concentración de levadura) y dos niveles (máximo y mínimo) como se resume en la tabla 6. El dominio experimental se estableció de acuerdo a la investigación realizada por Macías & Saavedra (2017) basada en investigaciones similares y recursos bibliográficos, en este estudio se optimizó las variables, para la máxima producción en el destilado de bioetanol, mientras que esta investigación lo hace para la concentración real de bioetanol de cada experimento.

Tabla 6 Identificación de variables y niveles para el diseño experimental.

Factor	Variable	Valor	
		Mínimo (-)	Máximo (+)
Temperatura (°C)	X ₁	25	35
pH (-log[H ⁺])	X ₂	4	5
Concentración de Levadura (g/L)	X ₃	1	3

Fuente: (Macías & Saavedra, 2017)

Elaboración: Autor

Se aplicó el diseño 2^3 ya que es bastante útil para las primeras fases de un trabajo de investigación, ya que conlleva realizar un número reducido de experimentos con los cuales pueden estudiarse los efectos de las variables en el proceso. (Montgomery, 1991)

De acuerdo a las condiciones presentadas para realizar un diseño experimental 2^3 se deben realizar 8 variantes de experimentos y un 9no con réplica que será el valor medio de los factores, tal como se detalla en la tabla 7. Extender la experimentación del diseño 2^3 aumentando niveles y variables traería resultados más aclaratorios pero no se lo realizó debido a la limitante de recursos y tiempo dispuesto para esta investigación.

Tabla 7 Matriz de diseño experimental 2³.

Experimento	X ₁	X ₂	X ₃
1	-	-	-
2	+	-	-
3	-	+	-
4	+	+	-
5	-	-	+
6	+	-	+
7	-	+	+
8	+	+	+
9	0	0	0

Fuente: (Macías & Saavedra, 2017)

Elaboración: Autor

El orden de los experimentos se realizó aleatoriamente con la finalidad de no confundir inintencionadamente los parámetros de operación. (Ferré, 2004)

La variable de salida que se analizó fue la concentración de bioetanol (g/L) producida durante el transcurso de la fermentación alcohólica del mucílago de cacao, esta variable fue determinada mediante el método de Winnick.

3.4.2. Cuantificación del bioetanol

Se determinó el bioetanol durante el experimento, desde antes de inocular la levadura hasta determinar cuándo la producción de bioetanol es estable durante al menos 24 horas, es decir la producción máxima de bioetanol. La cuantificación se realizó con el método de Winnick o microdifusión según se indica en la ilustración 5, se realizó un pretratamiento a las muestras con el fin de aislar en lo posible la parte líquida que contiene el bioetanol, de la biomasa, se centrifugó la muestra durante 15 minutos a 4000 rpm, del cual se extrajo 1 ml de sobrenadante, el cual se aforó a 100 ml con agua destilada. Este ensayo se realizó por triplicado, durante las primeras 24 horas del experimento, se tomaron muestras cada 6 horas, transcurrido este tiempo, se procedió a tomar muestras cada 12 horas hasta obtener 3 muestras con valores constantes en concentración.

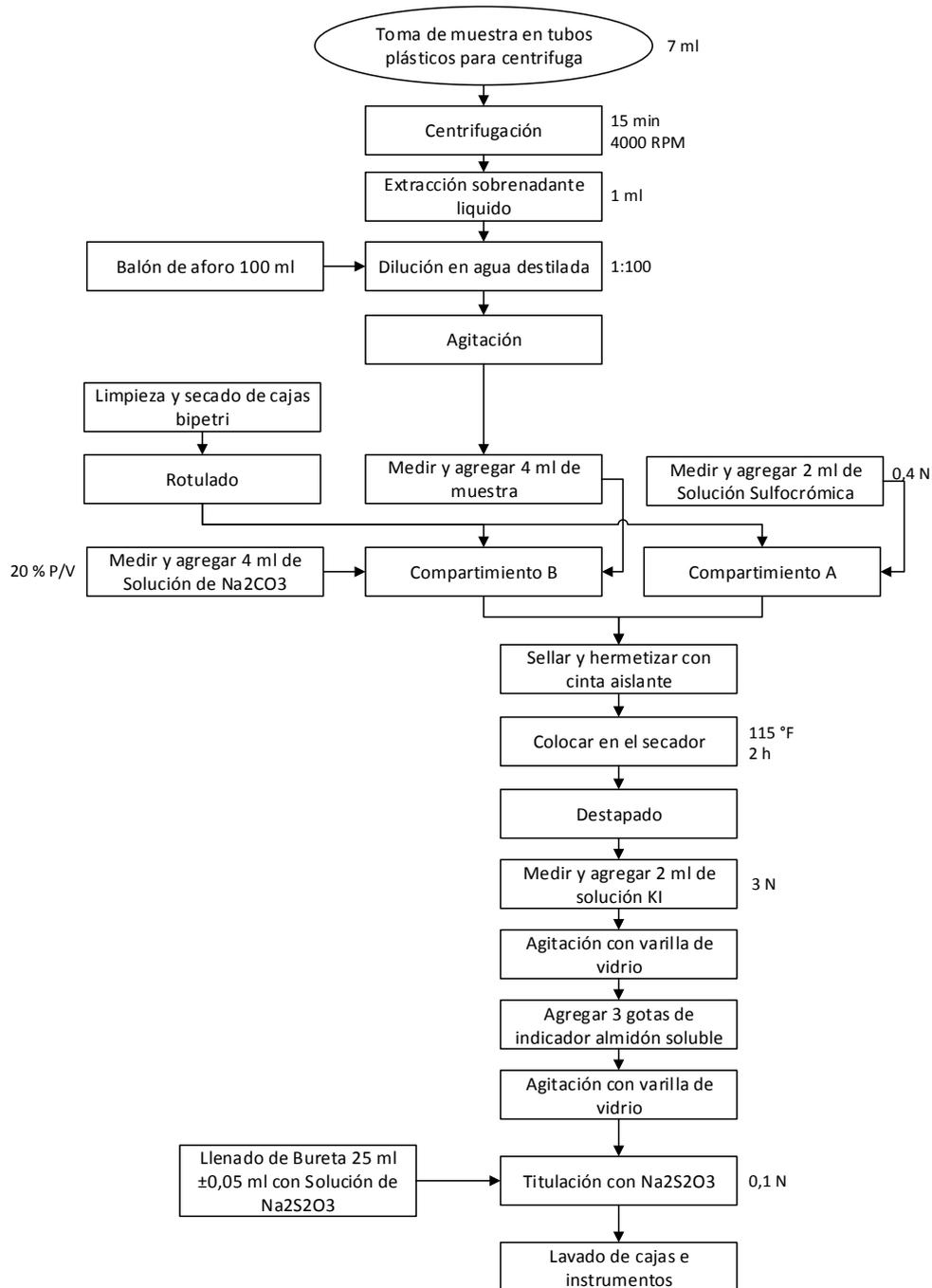


Ilustración 5 Esquema de pretratamiento de muestra y determinación de bioetanol por método de Winnick.

Fuente: (Augusto & Mora, 2015)

Elaboración: Autor

3.4.3. Determinación de los efectos de las variables

Los efectos son valores numéricos que se consiguen a partir del análisis estadístico del diseño experimental, para lograrlo se usó el software STATGRAPHICS®



Centurion XVI, que nos da directamente todos los resultados correspondientes al análisis del diseño experimental.

3.4.4. Determinación de los parámetros óptimos de operación

Para determinar los parámetros óptimos de operación hay que tener en cuenta el análisis correspondiente de la matriz experimental, del cual obtendremos los efectos de cada variable y nos permitirá evaluar los parámetros de operación de mayor rendimiento, en consecuencia a esto, los parámetros óptimos de operación dentro del rango ya expuesto, serán los correspondientes a la temperatura, pH y concentración de levadura del experimento que dio la mayor concentración máxima de bioetanol.

3.4.5. Descripción del proceso de fermentación alcohólica

La fermentación alcohólica se llevó a cabo en un biorreactor homogéneo de tanque agitado de marca *BiotronGX* de 2,5 L de capacidad en el laboratorio de Energía e Ingeniería de la Reacción del Tecnológico de la facultad de Ciencias Químicas de la Universidad de Cuenca. Se trabajó según se indica en la ilustración 6 de acuerdo a lo establecido en el dominio del diseño experimental se operó con las 3 variables ya citadas en el inciso 3.4.1 (matriz de diseño experimental); La duración de cada experimento se determinó cuando después de 24 horas, no hubo variación en la concentración de bioetanol y los grados Brix del mucílago, tomando en cuenta esto, los experimentos tuvieron una duración aproximada de 72 a 120 horas.

Se mantuvo constante la agitación en un valor de 250 rpm. Esto debido a dos razones: la primera es que de acuerdo a la bibliografía investigada es recomendado trabajar en intervalos de 200 a 400 rpm (Ferreira et al., 2012) y la segunda es debido al pre experimento realizado, el cual nos demostró que aumentar de 250 rpm generaba espuma en exceso, la cual requería ser extraída manualmente, alterando el ambiente controlado de la fermentación.

El mucílago de cacao naturalmente contiene un nivel de azúcares, que de acuerdo a diversos factores propios de la planta, varía entre de 17 y 18 Brix (Quizhpi, 2016), debido a esto en caso de ser necesario siempre antes de iniciar la fermentación se estandarizó este valor en 17 Brix con el fin de no introducir otra variable al sistema. Los Brix de mucílago obtenido nunca eran menores de 17 por lo que llegar a este valor se agregó agua destilada.

El pH durante la fermentación alcohólica tiene a disminuir con el tiempo, razón por la cual se necesitara de un regulador de pH, para este estudio se usó hidróxido de sodio, NaOH 1N el cual se agregaba de acuerdo a la disminución de pH a medida con el electrodo integrado al biorreactor.

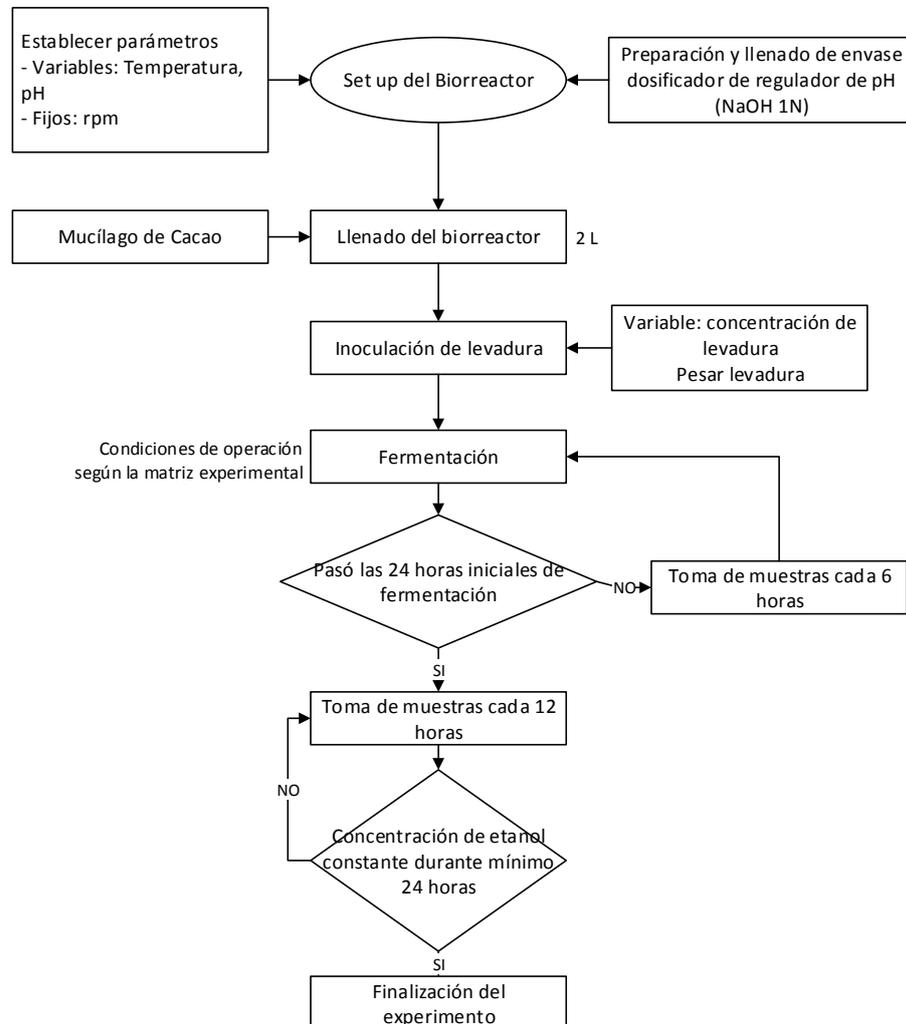


Ilustración 6 Esquema de proceso de fermentación alcohólica.

Fuente: (Macías & Saavedra, 2017)

Elaboración: Autor

3.5. MÉTODO PARA CUANTIFICACION DE BIOETANOL PRODUCIDO

Para determinar la curva de producción de bioetanol se evaluó el contenido de bioetanol mediante el método de Winnick a lo largo de la fermentación alcohólica en las respectivas condiciones de operación (Temperatura, pH y Concentración de levadura), con toma de muestras cada 6 horas durante las primeras 24 horas de experimentación y después de esto cada 12 horas hasta que se obtiene una concentración de bioetanol constante durante al menos 24 horas.



3.5.1. Determinación de bioetanol mediante método de Winnick o microdifusión

3.5.1.1 Técnica Utilizada

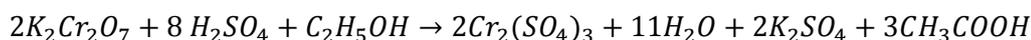
Microdifusión con cajas bipetri, esta técnica tiene el mismo fundamento y procedimiento que la microdifusión con cámaras Conway diferenciándose simplemente por el dispositivo hermético usado para que se dé la microdifusión.

3.5.1.2 Fundamento

El fundamento parte de la reacción de óxido-reducción, en este caso el bioetanol es oxidado a acetaldehído, ácido acético y agua. El ión crómico de coloración amarillo-naranja se reduce cuantitativamente a ión cromoso de coloración verde-azul, el mismo que se podrá determinar mediante técnicas de espectrofotometría o mediante Yodometría. (Vela, Rodríguez, Hernández, & Valdez, 2004)

Dentro de la caja bipetri herméticamente sellada la muestra libera el bioetanol contenido, el cual se difunde hacia el compartimiento con el dicromato de potasio, es decir el soluto volátil (bioetanol) tiende a pasar de la solución a la atmósfera y, de ésta, a disolverse en el solvente puro (dicromato de potasio), desplazando el soluto volátil en su totalidad hasta reducir la tensión de vapor en la caja a cero. El soluto volátil reaccionara con el solvente en una nueva sustancia, gracias a esto el solvente puro en exceso será susceptible a la cuantificación. (Augusto & Mora, 2015)

Una vez el bioetanol se ha transferido, este se oxidará en ácido acético debido a la presencia de la solución de dicromato de potasio en ácido sulfúrico.



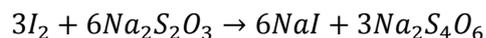
Ecuación 6 Reacción Oxido-Reducción método de Winnick

El exceso de dicromato que no ha reaccionado se debe cuantificar haciendo reaccionar con yoduro de potasio, de esta manera se liberara yodo.



Ecuación 7 Reacción de liberación de Yodo

El yodo liberado se estimará con una solución de tiosulfato de sodio y almidón como indicador.



Ecuación 8 Reacción de titulación de Yodo liberado

Se debe utilizar una solución de Carbonato de potasio junto con la muestra como agente liberador de bioetanol, el cual no interfiere de manera alguna con las reacciones.

3.5.1.3 Características del método

Este método no es específico para etanol, ya que determina de igual manera a sustancias oxidantes, lo que quiere decir que otros alcoholes como: metanol, propanaldehído, 2- propanol, formaldehído, acetaldehído, alcohol amílico, octanol, éter etílico y cualquier sustancia volátil en las condiciones del ensayo que se pueda oxidar con el dicromato de potasio produce resultados que no reflejan el contenido real de bioetanol en la muestra. Sin embargo en de acuerdo a investigaciones previas de la fermentación alcohólica, es claro que la producción de estos compuestos durante el proceso es mínima, reduciendo el error inducido por el método. Otros compuestos volátiles como el cloroformo, benceno, tetracloruro de carbono, tricloroetileno no producen falsos positivos. (Abril, 2014)

Para eliminar los falsos positivos resultantes de la composición natural del mucílago de cacao CCN-51 se realiza un blanco, el cual se tomará de una muestra de mucílago al iniciar la fermentación alcohólica.

La mayor parte de las técnicas para cuantificar etanol suelen ser poco confiables, debido a diversos factores entre ellos su elevado costo, sin embargo si se trabaja respetando el procedimiento este método presenta confiabilidad y un costo reducido, por lo que hace que este sea un excelente método para cuantificar el etanol en una muestra problema de cualquier tipo. (Ramos & Martínez, 2014)

3.5.1.4 Condiciones ambientales requeridas

Debido a la volatilidad del bioetanol, cuando se prepare las cajas bipetri con los respectivos reactivos para el ensayo se deberá trabajar en un espacio cerrado donde la temperatura no supere los 27 °C y la humedad relativa del ambiente deberá ser como máximo 80 %, de no seguir estas indicaciones se perderá exactitud en los resultados obtenidos. (Augusto & Mora, 2015)

3.5.1.5 Equipos y materiales

Tabla 8 Equipos y materiales Método de Winnick.

Equipos	Materiales
Secador de temperatura y tiempo programable.	Cajas bipetri (plástico o vidrio)
Balanza analítica	Bureta 25 ml
Centrifuga 4000 RPM	Pipetas de vidrio
	Tubos de plástico para centrifuga
	Varilla de vidrio
	Balones de aforo
	Vasos de precipitación
	Espátula
	Cinta aislante
	Frasco ámbar

Fuente: (Abril, 2014)

Elaboración: Autor

3.5.1.6 Procedimiento

Tomando en cuenta la concentración de la muestra a analizar se deberá realizar diluciones o no de la misma, esto se determinó haciendo ensayos previos en los cuales se variaba el factor de dilución hasta encontrar un rango donde se asegure la oxidación total del bioetanol contenido en la muestra sin quedar exceso del mismo. Trabajando con las proporciones detalladas en el procedimiento se comprobó que el rango de detección varía entre 0-40 g/L, por lo tanto se aplicó el siguiente procedimiento:

1. Rotulado de las cajas bipetri.
2. Colocar en el compartimiento A de la caja bipetri, 2 ml de solución de dicromato de potasio 0,4 N preparado en solución de ácido sulfúrico 10 N.
3. Colocar en el compartimiento B de la caja bipetri, 4 ml de muestra.
4. Colocar en el compartimiento B de la caja bipetri, 4 ml de solución de carbonato de potasio 20 % p/v.
5. Cerrar herméticamente la caja bipetri.
6. Rotar suavemente la caja bipetri para distribuir los fluidos dentro de sus respectivos compartimientos.
7. Dejar en reposo en el secador durante 2 horas a 50°C.
8. Transcurrido el tiempo de difusión observar la coloración del compartimiento A de la caja bipetri: Si el color es amarillo igual al de un control negativo, la muestra se considera libre de bioetanol o con una cantidad medible, si el color es azul, se debe repetir el análisis utilizando diluciones de la muestra. Si el color difiere hacia amarillo ocre, verde o verde azulado se debe proceder con la titulación.
9. Retirar cinta aislante y destapar las cajas bipetri.



10. Agregar 2 ml de solución de KI 3N en el compartimiento A, se debe agitar con una varilla de vidrio.
11. Agregar 3 gotas de la solución indicadora de almidón soluble en el compartimiento A.
12. Titular con solución de tiosulfato de sodio 0,1 N, con agitación hasta observar el viraje de coloración café a un nítido azul marino.
13. Registrar el volumen de tiosulfato de sodio.

Para un mejor entendimiento del proceso se adjuntaron fotografías (Anexo 14)

3.5.1.7 Recolección y procesamiento de datos

De acuerdo a la estequiometria de la reacción, la diferencia que hay entre el volumen de tiosulfato de sodio gastado en blanco y la muestra problema multiplicado por el factor 11,15 y por la normalidad del tiosulfato de sodio 0,1 N nos da como resultado los mg de bioetanol en 1 ml de muestra. (Augusto & Mora, 2015)

Se calcula el contenido de bioetanol en la muestra con la siguiente ecuación, donde el resultado se expresa en g/L.

$$Etanol \left(\frac{g}{L} \right) = \frac{N * (V_b - V_m)}{VM} * 11,51$$

Ecuación 9 Calculo de bioetanol en g/L

Nomenclatura:

N:	Normalidad del tiosulfato.
Vb:	Volumen de tiosulfato consumidos en la titulación del blanco.
Vm:	Volumen de tiosulfato consumidos en la titulación de la muestra.
VM:	Volumen de la muestra.
11,51:	Peso molecular del etanol / 4 (reacción Redox)

3.6. DETERMINACIÓN PARÁMETROS DE LA ECUACIÓN DE GOMPERTZ MODIFICADO

Para realizar el modelado de la producción de bioetanol se necesita primero las concentraciones de bioetanol a través del tiempo de cada experimento, los mismos que fueron obtenidos experimentalmente mediante el método de Winnick. Estos valores nos servirán para determinar los parámetros de la ecuación de Gompertz modificado.

$$P = P_{max} * exp \left\{ -exp \left[\left(\frac{r_{p.m} * exp(1)}{P_{max}} \right) * (t_l - t) + 1 \right] \right\}$$

Ecuación 10 Ecuación de Gompertz modificada

Nomenclatura:	
P:	Concentración de bioetanol, g/L
P_{max} :	Concentración máxima de bioetanol, g/L
r_{pm} :	Velocidad máxima de producción de bioetanol, g/L*h
t:	Tiempo de fermentación, h
t_l :	Tiempo de Fase lag
exp(1):	Numero de Euler

3.6.1. Determinación del tiempo lag o tiempo de latencia

El valor del tiempo de latencia, t_l es un parámetro obtenido del estudio previo realizado por Macías & Saavedra (2017)

3.6.2. Determinación de producción máxima de bioetanol

Utilizando los datos experimentales se obtuvo directamente el valor máximo de concentración de bioetanol, este parámetro es tomado independientemente de tiempo entre experimentos.

3.6.3. Determinación de velocidad máxima de producción de bioetanol

Teniendo los valores de concentración de bioetanol en cada experimento se utilizó la rutina “Método de mínimos cuadrados no lineales de Levenberg-Marquardt” la cual fue programada en MATLAB R2014a, esta rutina tiene como objeto modelar la ecuación de Gompertz modificado y proporcionar el parámetro r_{pm} (velocidad máxima de producción de bioetanol) el cual es diferente para cada experimento.

Este parámetro puede ser calculado experimentalmente sin realizar ajuste alguno, para hacerlo se debería medir la concentración de bioetanol en intervalos de 10 min o cada hora como mínimo, sin embargo lograr esto en la práctica, con el método de Winnick y con los recursos disponibles, no lo hace posible. Se intentó calcularlo con los intervalos realizados pero la estimación del parámetro varia significativamente, por lo que se descartó esta vía.

3.6.3.1 Rutina “Método de mínimos cuadrados no lineales de Levenberg-Marquardt”

```
clear all
clc
close all
options = optimoptions('lsqcurvefit','Algorithm','levenberg-marquardt','Display','iter-detailed','FunValCheck','on','FinDiffType','central');
lb = [];
ub = [];
x0 = 5;
load('base.mat')
[X,resnorm,residual,exitflag,output] = lsqnonlin(@gompertz,x0)
y = gompertz1(x);
plot(xdata,ydata(:,1),'o')
hold on
plot(xdata,y,'r')
R2 = 1-sum(residual.^2)/(length(xdata)-1)/var(ydata(:,1));
fprintf('El valor de R2 es: %1.4f\n\n',R2)
```

Ilustración 7 Script de la rutina “Método de mínimos cuadrados no lineales de Levenberg-Marquardt” en MATLAB R2014a (ajuste_rpm.m).

Fuente: MATLAB R2014a.

Elaboración: Autor.

```
function F = gompertz(rpm)
%UNTITLED2 Summary of this function goes here
% Detailed explanation goes here
Pmax = 19.18333333;
t1 = 2;
load('base.mat')
X = Pmax.*(exp(-exp(1+((t1-xdata)*(rpm*(exp(1)))/(Pmax)))));
F = X - ydata;

end
```

Ilustración 8 Script de la rutina “Método de mínimos cuadrados no lineales de Levenberg-Marquardt” en MATLAB R2014a (gompertz.m).

Fuente: MATLAB R2014a.

Elaboración: Autor.

```
function X = gompertz1(rpm)
%UNTITLED2 Summary of this function goes here
% Detailed explanation goes here
t1 = 2;
Pmax = 19.18333333;
load('base.mat')
X = Pmax.*(exp(-exp(1+((t1-xdata)*(rpm*(exp(1)))/(Pmax)))));
end
```

Ilustración 9 Script de la rutina “Método de mínimos cuadrados no lineales de Levenberg-Marquardt” en MATLAB R2014a (gompertz.m).

Fuente: MATLAB R2014a.

Elaboración: Autor.

El método de mínimos cuadrados no lineales de Levenberg-Marquardt se encuentra detallado mediante un diagrama de flujo (Anexo 3).



3.7. DETERMINACIÓN DE COEFICIENTES DE CORRELACIÓN

Una vez que se ha aplicado el modelo matemático de la ecuación de Gompertz modificado, se tendrá los valores modelados de concentración de bioetanol en el tiempo, por esto dentro de la misma rutina “Método de mínimos cuadrados no lineales de Levenberg-Marquardt” la cual fue programada en MATLAB R2014a, se incluyó el cálculo del valor conocido como coeficiente de correlación o coeficiente de determinación, que estipula la correlación existente entre los datos obtenidos mediante experimentación y modelado de la ecuación de Gompertz modificado. El coeficiente de correlación R^2 es un valor cuyo principal uso es determinar la calidad del modelo para replicar los resultados y la proporción de variación de resultados, es decir en que magnitud el modelado matemático se ha ajustado a la realidad. Por su definición: $0 < R^2 < 1$, donde el valor de 1 significa un ajuste perfecto y el valor de 0 indica la no representatividad del modelo. (Martínez Rodríguez, Cristina, & Lorenzo, 2005)

La interpretación del valor de R^2 varía de estudio a estudio, para que en una investigación en particular se considere “alto” o “bajo”, “aceptable” o “inaceptable” dentro del análisis estadístico este dependerá del tipo de datos, los estándares esperados del investigador y el R^2 calculada de estudios similares. Generalmente si un investigador estima un $R^2 > 0,75$ significará que el modelo de regresión impuesto tiene un poder explicativo más bien fuerte, sin embargo en la gran mayoría de estudios se consigue calcular valores de $R^2 > 0,95$ por lo que $R^2 = 0,75$ se consideraría un valor relativamente bajo, por lo tanto dependerá del estudio en sí. (Keat & Young, 2004)

CAPÍTULO 4. ANÁLISIS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS

4.1. OPTIMIZACIÓN DE CONDICIONES DE OPERACIÓN EN LA FERMENTACIÓN ALCOHÓLICA

En la fermentación alcohólica se trabajó variando los parámetros de operación ya establecidos con anterioridad; temperatura (X_1), pH (X_2) y concentración de levadura (X_3), variables que fueron seleccionadas debido a su significancia en procesos fermentativos, además de estas existen otras variables que afectan el proceso de la fermentación alcohólica, como es el caso de la disponibilidad de nutrientes, factor que no fue introducido como variable ya que se requiere evidenciar el consumo real de sustrato propio del mucílago.

4.1.1. Resultados cuantificación de concentración de bioetanol en la muestra del diseño experimental

Se realizó un diseño experimental 2^3 en el cual la variable respuesta fue la concentración de bioetanol, la cual fue cuantificada mediante el método de Winnick. En la tabla 9 se muestran los resultados experimentales. Adicional a esto se calculó la productividad de cada experimento usando la ecuación 10 donde la concentración de bioetanol fue la máxima registrada y el tiempo de fermentación fue el tiempo que le tomó al proceso llegar a este punto.

$$Productividad = \frac{\text{Concentración de bioetanol (g/L)}}{\text{Tiempo de fermentación (h)}}$$

Ecuación 11 Ecuación para el cálculo de la productividad del proceso fermentativo.

Tabla 9 Resultados de la concentración máxima de bioetanol en los experimentos.

Experi mento	Parámetros de operación			Concentra ción de bioetanol (g/L)	Tiempo concentraci ón máxima de bioetanol (h)	Productivid ad del proceso (g/L*h)
	Temperatur a °C	pH	Concentraci ón de levadura g/L			
1	25	4	1	19,6629	70	0,2808
2	35	4	1	20,1425	50	0,4028
3	25	5	1	16,1140	30	0,5371
4	35	5	1	19,6629	47	0,4183
5	25	4	3	21,1016	80	0,2637
6	35	4	3	22,0608	34	0,6488
7	25	5	3	16,3058	96	0,1698
8	35	5	3	18,2241	44	0,4141
9-1*	30	4,5	2	19,1833	57	0,3365
9-2*	30	4,5	2	19,1833	46	0,4170

*Se realizó una réplica del experimento 9

Fuente: Autor.

Elaboración: Autor.

Los valores reportados son las concentraciones máximas de bioetanol durante cada uno de los experimentos. El resultado de mayor magnitud fue el experimento 6 con un valor de 22,0608 g/L.

Los resultados de concentración máxima de bioetanol obtenidos se encuentran dentro de un rango factible ya que en investigaciones similares como la realizada por Zahed, Jouzani, Abbasalizadeh, Khodaiyan, & Tabatabaei (2016) se cuantificó un total de bioetanol de 31,681 g/L, también en el estudio realizado por Pimpakan, Yongmanitchai, & Limtong (2012) donde se cuantificó un máximo de 111,84 g/L. sin embargo estos estudios se realizaron con otras materias primas con mayores concentraciones de sustrato.

4.1.2. Análisis del diseño experimental

Se realizó el análisis del diseño experimental usando el software STATGRAPHICS® Centurion XVI a continuación se resumen los resultados.

4.1.2.1 Estadístico P

El primer resultado analizado fue el estadístico P, estos valores reportados en la tabla 10 determinan el grado de significancia de cada efecto de las variables independientes sobre el modelo, un efecto con un valor P inferior a 0,05 es estadísticamente significativo para niveles de confianza del 95%. En esta investigación se reportaron 4 factores significativos.

Tabla 10 Valores del estadístico P.

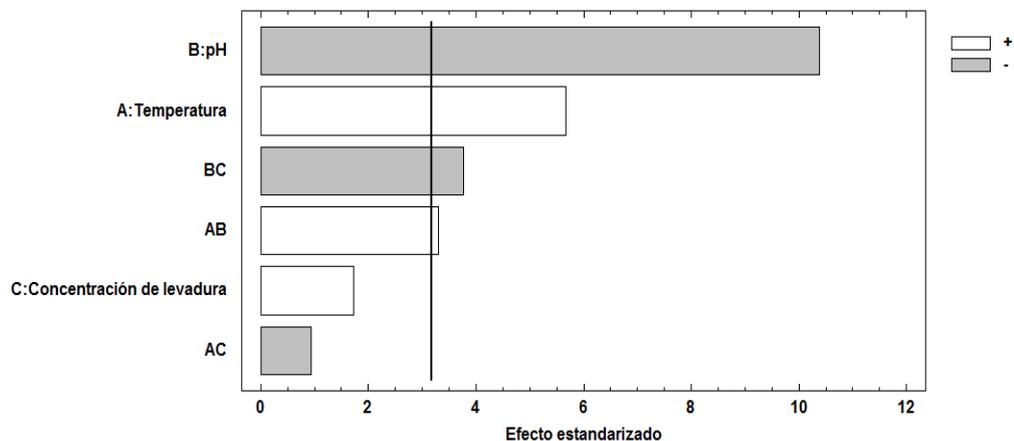
Fuente	P - Valor
A: Temperatura	0,0109
B: pH	0,0019
C: Concentración de levadura	0,1820
AB	0,0425
AC	0,4148
BC	0,0325

Fuente: STATGRAPHICS® Centurion XVI.

Elaboración: Autor.

4.1.2.2 Diagrama de Pareto

Los valores del estadístico P presentados en la tabla 10 se explican de mejor manera con el diagrama de Pareto expuesto en la ilustración 10.

**Ilustración 10** Diagrama de Pareto de los efectos principales a un nivel de confianza del 95%.

Fuente: STATGRAPHICS® Centurion XVI.

Elaboración: Autor.

Como se observa en la ilustración 10, en el diagrama de Pareto se presenta cada uno de los efectos estimados en orden decreciente de magnitud. Los valores que sobrepasan la línea vertical son los que son estadísticamente significativos con un 95% del nivel de confianza. Existen 4 efectos significativos, estos son: el pH, la temperatura, la combinación de pH-Concentración de levadura y temperatura-pH, dejando como insignificantes el efecto provocado por la concentración de levadura y la combinación de temperatura-Concentración de levadura.

Se puede verificar la significancia de estos efectos comparando con un estudio similar realizado por Jácquez, Soto, Rutiaga, & Páez (2015), donde se analiza que efectos son los que tienen mayor significancia en los procesos fermentativos para la producción de etanol a partir de lactosuero. En este trabajo se observa que los efectos

estadísticamente significativos (nivel de confianza del 95%) en orden decreciente son: Agitación, pH, Tratamiento del inoculo y temperatura, mientras que los estadísticamente insignificantes (nivel de confianza del 95%) en orden decreciente son: tipo de sustrato, concentración de inoculo y nitrógeno.

4.1.2.3 Coeficientes de relación para la concentración de bioetanol

Se obtuvo la ecuación polinomial del diseño experimental que se ha ajustado a los datos respecto a los resultados obtenidos. En donde los valores de las variables están en sus unidades originales: y : concentración de bioetanol (g/L); X_1 : temperatura (°C); X_2 : pH y X_3 : Concentración de levadura (g/L).

$$y = 42,8076 - 0,676213 X_1 - 6,906 X_2 + 6,30652 X_3 + 0,201425 X_1 X_2 - 0,028775 X_1 X_3 - 1,151 X_2 X_3$$

Ecuación 12 Ecuación polinomial resultados concentración de bioetanol

4.1.2.4 Interacción entre variables

Tabla 11 Resultado de los efectos. Temperatura (X1), pH (X2), Concentración de levadura (X3).

Efecto		Valor
Promedio	B0	19,1641
X1	B1	1,7265
X2	B2	-3,1652
X3	B3	0,5275
X1* X2	B12	1,0071
X1* X3	B13	-0,2877
X2* X3	B23	-1,151

Fuente: STATGRAPHICS® Centurion XVI.

Elaboración: Autor.

El valor promedio $B_0 = 19,1641$ estipula la media de las variables respuesta, dentro del análisis de la matriz nos indica el centro calculado del dominio, ya que el centro experimental del dominio fue 19,1833 se indica que los valores calculados y experimentados concuerdan por lo tanto el dominio experimental no debe ser alterado.

Para los efectos primarios el valor calculado de estos (B_1 , B_2 y B_3) mide cómo afecta cada variable directamente a la producción de bioetanol. De acuerdo a los resultados expresados en el análisis la variable de mayor relevancia es el pH, con un efecto negativo, es decir el rendimiento de la fermentación aumenta a medida que disminuye el pH (de 5 a 4). Asimismo, variar la temperatura de 25°C a 35°C afecta positivamente el rendimiento, pero en menor grado en comparación con el pH. Estas

dos afirmaciones concuerdan con la investigación “Efecto de la temperatura y el pH en la fermentación del mosto de *Agave cocui*” realizada por Granadillo, Rodríguez, Hernández, & Morán (2014) donde se obtiene un mejor rendimiento en la producción de etanol cuando el pH disminuye de 5 a 3, siendo 4 el valor óptimo y la temperatura aumenta, de 27 a 37°C, siendo 33°C el valor óptimo. En último lugar, al aumentar la concentración de levadura de 1g/L a 3g/L se obtiene un mejor rendimiento sin embargo este factor es el de mucho menor notabilidad, este aumento de rendimiento es validado por el estudio realizado por Jácquez, Soto, Rutiaga, & Páez (2015) en donde se varía la concentración del inóculo de (1×10^6 a 1×10^7 cel./ml) y se consigue un efecto positivo de esta variable aunque de menor efecto en comparación a la temperatura y pH.

Para los efectos secundarios, en orden de significancia: cuando se combina pH y concentración de levadura el rendimiento aumenta positivamente, cuando se combina temperatura y pH el rendimiento es afectado negativamente, finalmente cuando se combina temperatura y concentración de levadura el resultado es afectado positivamente.

4.1.3. Parámetros óptimos de operación

De acuerdo a los resultados de mayor concentración de bioetanol y al análisis realizado en STATGRAPHICS® Centurion XVI se determinó que los parámetros óptimos de operación para la máxima producción de bioetanol dentro de los rangos establecidos en el dominio experimental.

Tabla 12 Resultados de parámetros óptimos para maximizar la producción de bioetanol.

Factor	Bajo	Alto	Óptimo
Temperatura (°C)	25	35	35
pH	4	5	4
Concentración de levadura (g/L)	1	3	3

Fuente: STATGRAPHICS® Centurion XVI.

Elaboración: Autor.

Los valores de estos factores coinciden al experimento 6 de la matriz experimental donde se registra experimentalmente una máxima concentración de bioetanol de 22,0608 g/L.

Estos resultados son similares al estudio realizado por Granadillo, Rodríguez, Hernández, & Morán (2014). Donde se analizó el efecto del pH y la temperatura en la fermentación del mosto *Agave cocui* para la producción artesanal del licor denominado Cocuy Pecayero, para lo cual realizaron fermentaciones variando la temperatura (27 a 37 °C) manteniendo el pH constante, seguido a esto variando el pH (3 a 5) manteniendo

constante la temperatura, concluyendo que a una temperatura de 33°C y un pH de 4 se observó el mayor consumo de azúcares y mayor producción de etanol.

4.1.4. Análisis de resultados del experimento 6

En la tabla 13 se muestran los resultados de el volumen de titulante que se usó para determinar la concentración de bioetanol para cada punto obtenidos del experimento 6 de la matriz experimental, para estos resultados se calculó el porcentaje de error relativo con respecto al valor promedio usando el software Excel.

Tabla 13 Resultados obtenidos en la titulación del método de Winnick para determinación de bioetanol en el experimento 6.

Muestra	Tiempo (h)	Volumen gastado de tiosulfato de sodio (ml)			Porcentaje de error relativo con respecto al valor promedio (%)		
		Muestra	Muestra	Muestra	Muestra	Muestra	Muestra
		A	B	C	A	B	C
Blanco	0,0	6,2	6,3	6,25	0,80	0,80	0,00
1	6,0	5,8	5,95	5,8	0,85	1,71	0,85
2	12,0	5,9	5,75	5,8	1,43	1,15	0,29
3	19,0	5,7	5,7	5,7	0,00	0,00	0,00
4	21,5	5,55	5,6	5,5	0,00	0,90	0,90
5	25,5	5,6	5,6	5,55	0,30	0,30	0,60
6	30,0	5,5	5,55	5,5	0,30	0,60	0,30
7	34,0	5,5	5,45	5,5	0,30	0,61	0,30
8	47,5	5,5	5,5	5,5	0,00	0,00	0,00
9	59,0	5,5	5,55	5,5	0,30	0,60	0,30

*Parámetros de operación. Experimento 6: temperatura (35°C), pH (4) y concentración de levadura (3 g/L).

Fuente: Autor.

Elaboración: Autor.

Debido a que se desconoce el valor real de cada medición se realizará un promedio entre los 3 valores reportados ensayo y se tomara este dato como valor real en el respectivo punto. Tal como se expone en la tabla 13 el porcentaje de error relativo no supera el valor del 2% por lo que todos y cada uno de los valores reportados en cada muestra fueron tomados en cuenta para calcular un promedio del punto respectivo. De acuerdo a este promedio se procedió a calcular el valor de la concentración de bioetanol en la muestra de acuerdo a la ecuación 8 cuyos resultados se muestran en la tabla 14. Adicional a esto y solo como dato de referencia se midió los grados Brix de la muestra para corroborar el estado estacionario de producción de bioetanol.

Tabla 14 Resultados de la concentración de bioetanol del experimento 6.

Muestra	Tiempo (h)	Promedio del volumen gastado de tiosulfato de sodio (ml)	Concentración de bioetanol en la muestra (g/L)	Brix
Blanco	0,0	6,25	0	17,0
1	6,0	5,85	11,51	15,0
2	12,0	5,8166	12,4691	12,0
3	19,0	5,7	15,8262	10,0
4	21,5	5,55	20,1425	9,0
5	25,5	5,5833	19,1833	7,5
6	30,0	5,5166	21,1016	6,5
7	34,0	5,4833	22,0608	6,0
8	47,5	5,5	21,5812	6,0
9	59,0	5,5166	21,1016	6,0

Fuente: Autor.

Elaboración: Autor.

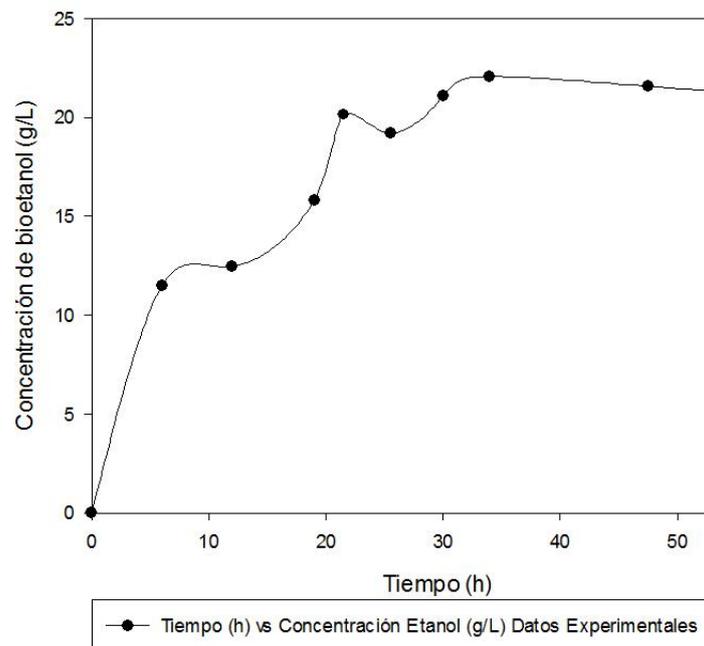
Curva de producción de bioetanol (Experimento 6 de la matriz experimental)

Ilustración 11 Producción de bioetanol durante la fermentación alcohólica (Experimento 6 de la matriz experimental).

Fuente: Autor.

Elaboración: Autor.

Los puntos en la gráfica muestran notoriamente la tendencia de crecimiento de la producción de bioetanol, sin embargo se observa que existen ligeras desviaciones de la curva, esto se pudo dar debido a errores por parte del investigador en el procedimiento del método de Winnick. Este experimento duró un total de 59 horas y se logró llegar a una concentración máxima de bioetanol de 22,0608 g/L a la hora 34, después esto la producción de bioetanol cesó por completo con una ligera tendencia a la baja.

(considerada despreciable) probablemente debido a la producción de ácido acético, paralelo a esto se confirmó el estado estacionario con la estabilidad en los grados Brix que alcanzaron un valor mínimo de 6. Se logró llegar a una concentración máxima de bioetanol de 22,0608 g/L en la hora 34 del experimento.

4.2. MODELADO DE LA ECUACION DE GOMPERTZ MODIFICADO

Se aplicó el modelado de la ecuación de Gompertz modificado a cada uno de los experimentos de la matriz experimental. Para realizar el modelado matemático se utilizó el software MATLAB R2014a en el cual se programó la rutina “Método de mínimos cuadrados no lineales de Levenberg-Marquardt” con el fin de ajustar los datos experimentales a la ecuación de Gompertz modificado, obtener el parámetro r_{pm} y el coeficiente de correlación de datos experimentales y modelados R^2 .

4.2.1. Curva ajustada con al modelo de la ecuación de Gompertz modificado Experimento 6

Tabla 15 Comparación de resultados (experimentales – modelados) experimento 6.

Muestra	Tiempo (h)	Concentración de bioetanol en muestras (g/L)	Concentración de bioetanol en el modelado de Gompertz modificado (g/L)
Blanco	0,0	0	0,521647471
1	6,0	11,51	5,266421216
2	12,0	12,4691	12,75382134
3	19,0	15,8262	18,45255013
4	21,5	20,1425	19,57257881
5	25,5	19,1833	20,71253347
6	30,0	21,1016	21,39437223
7	34,0	22,0608	21,70707952
8	47,5	21,5812	22,01982606
9	59,0	21,1016	22,05432422

Elaboración: Autor.

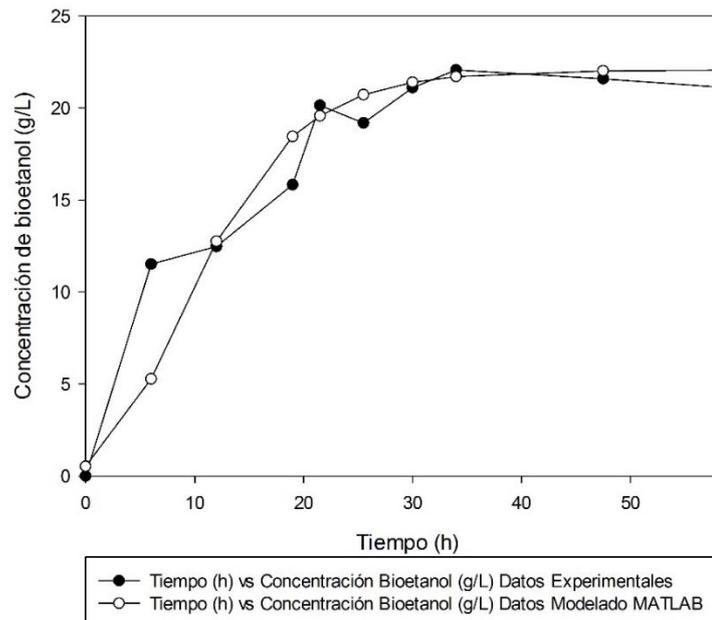


Ilustración 12 Resultados experimentales y modelado de la ecuación de Gompertz modificado experimento 6.

Elaboración: Autor.

Como se observa en la ilustración 12 la curva de datos experimentales tiene puntos que se desvían de la tendencia, esto se pudo dar debido al nivel de precisión del método de Winnick. Mientras que la curva de datos modelados presenta obviamente una tendencia típica de la ecuación de Gompertz modificado. se observa además una similitud entre ambas curvas, similitud que se evaluará con el cálculo del coeficiente de correlación R^2 . Se realizó el modelado para todos los experimentos realizados, estos resultados se encuentran en los Anexos (4-13).

4.2.2. Resultados velocidad máxima de producción de bioetanol r_{pm} (g/L*h)

Tabla 16 Resultados del valor ajustado de la velocidad máxima de producción de bioetanol r_{pm} .

Resultados Modelado MATLAB R2014a	
Experimento	r_{pm} (g/L*h)
1	0,4575
2	0,5162
3	0,7689
4	1,0369
5	0,5449
6	1,2928
7	0,4299
8	0,6371
9-1	0,6154
9-2	0,6787

Elaboración: Autor.



El valor ajustado de la velocidad máxima de producción de bioetanol r_{pm} es un parámetro de la ecuación de Gompertz modificado, que está íntimamente ligado a la productividad del proceso fermentativo, como se ve en la tabla 16 alcanza un valor máximo para el experimento óptimo. El valor de r_{pm} alcanza valores más altos cuando se obtiene un valor mayor de concentración de etanol en la fermentación, por ejemplo en el estudio realizado por Dodić et al., (2012) para un concentración máxima de etanol de 73,31 g/L se calcula un r_{pm} es de 4,39 g/L*h.

4.2.3. Resultados Coeficientes de correlación

Tabla 17 Resultados del valor de R^2 en el modelado en MATLAB R2014a de la ecuación de Gompertz modificado.

Resultados Modelado MATLAB R2014a	
Experimento	R^2
1	0,8816
2	0,9538
3	0,9323
4	0,9590
5	0,8011
6	0,8842
7	0,9457
8	0,9668
9-1	0,9798
9-2	0,9922

Elaboración: Autor.

El valor del estadístico R^2 es independiente para cada experimento, los resultados expuestos en la tabla 16 demuestran que los datos modelados se ajustaron de buena manera al modelo de la ecuación de Gompertz modificado ($R^2 > 0,8816$), excepto para el experimento 5 donde vemos un menor ajuste del modelado matemático ($R^2 = 0,8011$), esto podría deberse a un error en el control del experimento o que el modelo de la ecuación de Gompertz no se ajusta de buena manera bajo estas condiciones específicas de operación.

En general se obtuvo un buen ajuste del modelo matemático de Gompertz modificado, sin embargo ya que uno de los objetivos de esta investigación es optimizar la producción de bioetanol, el experimento de mayor concentración será el óptimo, es decir el experimento 6, en el cual se logró tener un buen ajuste de datos ($R^2 = 0,8842$). El valor obtenido de R^2 es corroborado por otros estudios donde se modela la ecuación de Gompertz para la producción de etanol con diversos tipos de sustratos, estos coeficientes son expuestos en la tabla 18. Comparando estos estudios con los datos obtenidos en este trabajo de titulación se observa que aunque los R^2 son mayores no

existe una variación significativa, por lo tanto es acertado decir que el modelo de Gompertz modificado se ajusta a la producción de bioetanol bajo las condiciones óptimas de operación.

Tabla 18 Valores de R^2 del modelado de la ecuación de Gompertz modificado para la producción de etanol a partir de distintos sustratos.

Materia prima utilizada para la fermentación	Valor de R2 modelado de la ecuación Gompertz modificado para la producción de etanol	Articulo	Referencia bibliográfica
Jugo de sorgo dulce	0,9981	“Kinetic models for batch ethanol production from sweet sorghum juice under normal and high gravity fermentations: Logistic and modified Gompertz models”	(Phukoetphim et al., 2017)
Jugo crudo de remolacha azucarera	0,9910	“Kinetic modelling of batch ethanol production from sugar beet raw juice”	(Dodić et al., 2012)
Cascarilla de arroz hidrolizada	0,9957	“Continuous co-production of ethanol and xylitol from rice straw hydrolysate in a membrane bioreactor”	(Zahed et al., 2016)
Jugo diluido de caña de azúcar	0,9851	“Bioethanol production from sugar cane syrup by thermo-tolerant yeast, <i>Kluyveromyces marxianus</i> DMKU3-1042, using fed-batch and repeated-batch fermentation in a nonsterile system”	(Pimpakan et al., 2012)

Elaboración: Autor.



CAPÍTULO 5. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1. CONCLUSIONES

El mucílago de cacao CCN-51 representa una materia prima con un gran potencial para la obtención de bioetanol, puesto que, para la cantidad de azúcares reductores que contiene, tiene viabilidad en procesos fermentativos. Además de que se encuentra de manera abundante en el Ecuador ya que es un residuo de la creciente industria cacaotera.

La cuantificación de bioetanol mediante el método de Winnick ofrece resultados reproducibles y precisos en procesos fermentativos de mucílago de cacao CCN-51.

La aplicación un diseño experimental completo 2^3 en este estudio, permitió establecer dos aspectos fundamentales: primero determinar el efecto que tiene cada variable independiente (temperatura, pH y concentración de levadura), y las interacciones de estos parámetros en la experimentación; la segunda es la optimización de parámetros de operación en el proceso discontinuo de fermentación del mucílago de cacao CCN-51.

La productividad del proceso aumenta con: el descenso del pH (5 – 4), con el incremento de temperatura de (25 – 35) °C y el incremento de la concentración de levadura de (1 – 3) g/L. Siendo los parámetros óptimos de operación los registrados en el experimento 6: temperatura (35 °C), pH (4) y concentración de levadura (3g/L) que arrojan la concentración máxima de bioetanol (22,0608 g/L) con una productividad del proceso de 0,6488 g/L*h.

La rutina “Método de mínimos cuadrados no lineales de Levenberg-Marquardt” programada en MATLAB R2014a permitió ajustar el parámetro de velocidad máxima de producción de bioetanol “ r_{pm} ” de la ecuación de Gompertz modificado el cual varia de acuerdo a las condiciones de operación, teniendo un valor de 1,2998 g/L*h para el experimento óptimo.



Se desarrolló con éxito el modelo de la ecuación de Gompertz modificado para la producción de bioetanol en procesos fermentativos discontinuos a partir de mucílago de cacao CCN-51 en las condiciones óptimas de operación. Se obtuvo un buen ajuste de los datos de concentración de bioetanol ($R^2=0,8842$).

El modelo matemático realizado partir de la ecuación de Gompertz modificado resulta útil en fermentaciones discontinuas de mucílago de cacao CCN-51 con *Saccharomyces cerevisiae* ya que describe la producción de bioetanol en el tiempo.

5.2. RECOMENDACIONES

Con la finalidad de optimizar en mayor medida la productividad de la fermentación alcohólica del mucílago de cacao CCN-51 se recomienda experimentar con valores de pH cercanos al óptimo, debido que este factor es el de mayor influencia en la fermentación, adicional a esto se podría trabajar con rangos más altos de concentración de levadura ya que se ha demostrado de acuerdo a fuentes externas que en fermentaciones anaerobias no existe un límite de concentración de levadura siempre y cuando se disponga de sustrato en el medio.

Para incrementar el coeficiente de correlación de los datos experimentales, se recomienda cuantificar el bioetanol obtenido mediante métodos instrumentales, ya que estos son más precisos y exactos, además de depender en menor grado de la técnica del investigador.

Con el objetivo de predecir de mejor manera la producción de bioetanol es preciso desarrollar el modelado del proceso con otros modelos matemáticos y comprobar su eficacia en procesos fermentativos discontinuos a partir de mucílago de cacao CCN-51



REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- Abril, C. (2014). *Determinación de etanol con fines medicos y medico legales*. Universidad Católica de Cuenca.
- Arciniegas Leal, A. M. (2005). Caracterización de árboles superiores de cacao (*Theobroma cacao* L.) seleccionados por el programa de mejoramiento genético del CATIE.
- Augusto, J., & Mora, H. (2015). Producción de etanol a partir de glicerina por vía fermentativa con *Saccharomyces cerevisiae* y simulación del proceso a escala industrial.
- BNDES, CGEE, CEPAL, & FAO. (2008). *Bioetanol de Caña de azúcar: Energía para el desarrollo sostenible*. Rio de Janeiro.
- Coll C, F., Giannuzzi, L., Noia, M. A., & Zaritzky, N. (2001). El Modelado Matematico: Una Herramienta Util para la Industria Alimenticia. *Ciencia Veterinaria* ., 22–28.
- Dodić, J. M., Vučurović, D. G., Dodić, S. N., Grahovac, J. A., Popov, S. D., & Nedeljković, N. M. (2012). Kinetic modelling of batch ethanol production from sugar beet raw juice. *Applied Energy*, 99, 192–197. <https://doi.org/10.1016/j.apenergy.2012.05.016>
- Durango Londoño, L. P. (2007). Evaluacion Y Escalonamiento De La Produccion De Levaduras Nativas Tipo *Saccharomyces* Spp. a Nivel De Laboratorio., 131.
- El Telégrafo. (2017, May 20). Acuerdo para proveer alcohol a programa Ecopais se firmó. *El Telégrafo*. Retrieved from <https://www.eltelgrafo.com.ec/noticias/economia/8/acuerdo-para-proveer-alcohol-a-programa-ecopais-se-firmo>
- Ferré, J. (2004). El diseño factorial completo 2 k, 1–10. Retrieved from <http://www.quimica.urv.es/quimio/general/disfact.pdf>
- Ferrel Quispe, M. P. (2011). Determinación de etanol en bebidas refrescantes por método enzimático.
- Ferreira, M., Schvab, M., Davies, C., Gerard, L., & Hours, R. (2012). Influencia del caudal de aire , temperatura y velocidad de agitación en el proceso discontinuo de acetificación para la obtención de vinagre de naranja (*Citrus sinensis* var.W. Navel). *Scientia Agroecuaría*, 3, 61–65.
- García, P., & Edilma, E. (2014). GENERALIDADES DEL CACAO (*Theobroma cacao* L.), USOS Y APLICACIONES EN LA INDUSTRIA ALIMENTARIA.
- Garzón Castaño, S. C., & Hernandez Londoño, C. (2009). *Estudio comparativo para la producción de etanol entre Saccharomyces cerevisiae silvestre, Saccharomyces cerevisiae ATCC 9763 y Candida utilis ATCC 9950*. Universidad Tecnológica de Pereira.
- Gracia, C. (2004). Bioetanol. *Biocombustibles: ¿Energía O Alimento?*, 77–103. Retrieved from http://www.ub.edu/ecologia/carlos.gracia/PublicacionesPDF/Capitulo_4_Bioetanol.pdf
- Granadillo, I., Rodríguez, G., Hernández, R., & Morán, H. (2014). *Efecto de la temperatura y el pH en la fermentación del mosto de Agave cocui* (Vol. 14). Coro.
- Griffin, R. W. (1981). *Química orgánica moderna*. reverté.
- INEC. (2016). *Encuesta de Superficie y Producción Agropecuaria Continua (ESPAC) 2014*. Quito, Ecuador.



- Jáquez, L., Soto, N., Rutiaga, O., & Páez, J. (2015). Evaluación de las variables de Fermentación para la reducción de etanol a partir de lactosuero. *XVI Congreso Nacional de Biotecnología Y Bioingeniería*, 3(2), 1.
- Jagannath, A., & Tsuchido, T. (2003). Predictive Microbiology: A Review. *Biocontrol Science*, 8(1), 1–7. <https://doi.org/10.4265/bio.8.1>
- Kalvatchev, Z., Garzaro, D., & Guerra, F. (1998). Theobroma Cacao L. : Un nuevo enfoque para nutrición y salud. *Agroalimentaria*, 6, 23–25.
- Keat, P. G., & Young, P. K. Y. (2004). *Economía de empresa*. Pearson Educación.
- Kirkwood, T. (2015). Deciphering death: a commentary on Gompertz (1825) “On the nature of the function expressive of the law of human mortality, and on a new mode of determining the value of life contingencies.” *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 370(1666), 20140379–20140379. <https://doi.org/10.1098/rstb.2014.0379>
- López, C. G. (2017). Taxonomía de levaduras de origen enológico por espectrometría de masas.
- Macías, S., & Saavedra, M. (2017). Determinación de la cinética de fermentación alcohólica del mucílago de cacao ccn-51 en condiciones óptimas de operación de temperatura, ph y concentración de levadura”. caso: ecuador-zona 6.
- Martín Barry, A. M. de. (2005). *Control del metabolismo de Saccharomyces cerevisiae en la síntesis de glutación*.
- Martínez Rodríguez, E., Cristina, E., & Lorenzo, S. (2005). Errores frecuentes en la interpretación del coeficiente de determinación lineal. *Anuario Jurídico Y Económico Escurialense*, 38, 315–332.
- Melo, E., Sánchez, Y., Ferrer, N., & Ferrer, N. (2012). Evaluación de un motor de encendido por chispa trabajando con mezclas etanol-gasolina. *Ingeniería Energética*, 33(2), 94–102. Retrieved from <http://scielo.sld.cu/pdf/rie/v33n2/rie02212.pdf>
- Mesas, J. M., & Alegre, M. T. (1999). El Papel De Los Microorganismos En La Elaboración Del Vino the Role of the Microorganisms in Winemaking O Papel Dos Microorganismos Na Elaboración Do Viño. *Ciencia Y Tecnología Alimentaria*, 2(4), 174–183. <https://doi.org/10.1080/11358129909487599>
- Montgomery, D. C. (1991). *Diseño y análisis de experimentos*. Grupo Editorial Iberoamérica,.
- Morales, D. (2010). LA INDUSTRIA DE LOS BIOCOMBUSTIBLES EN ECUADOR: el estado de situación, 0–136.
- Narváez, D. E., & Quito, N. Y. (2015). Estandarización del Método para Alcoholemias por Cromatografía de Gases. Retrieved from <http://dspace.ucuenca.edu.ec/bitstream/123456789/21835/1/TESIS.pdf>
- Phukoetphim, N., Salakkam, A., Laopaiboon, P., & Laopaiboon, L. (2017). Kinetic models for batch ethanol production from sweet sorghum juice under normal and high gravity fermentations: Logistic and modified Gompertz models. *Journal of Biotechnology*, 243, 69–75. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2016.12.012>
- Pimpakan, P., Yongmanitchai, W., & Limtong, S. (2012). Bioethanol production from sugar cane syrup by thermo-tolerant yeast, *kluveromyces marxianus* DMKU3-1042, using fed-batch and repeated-batch fermentation in a nonsterile system.



Kasetsart Journal - Natural Science, 46(4), 582–591.

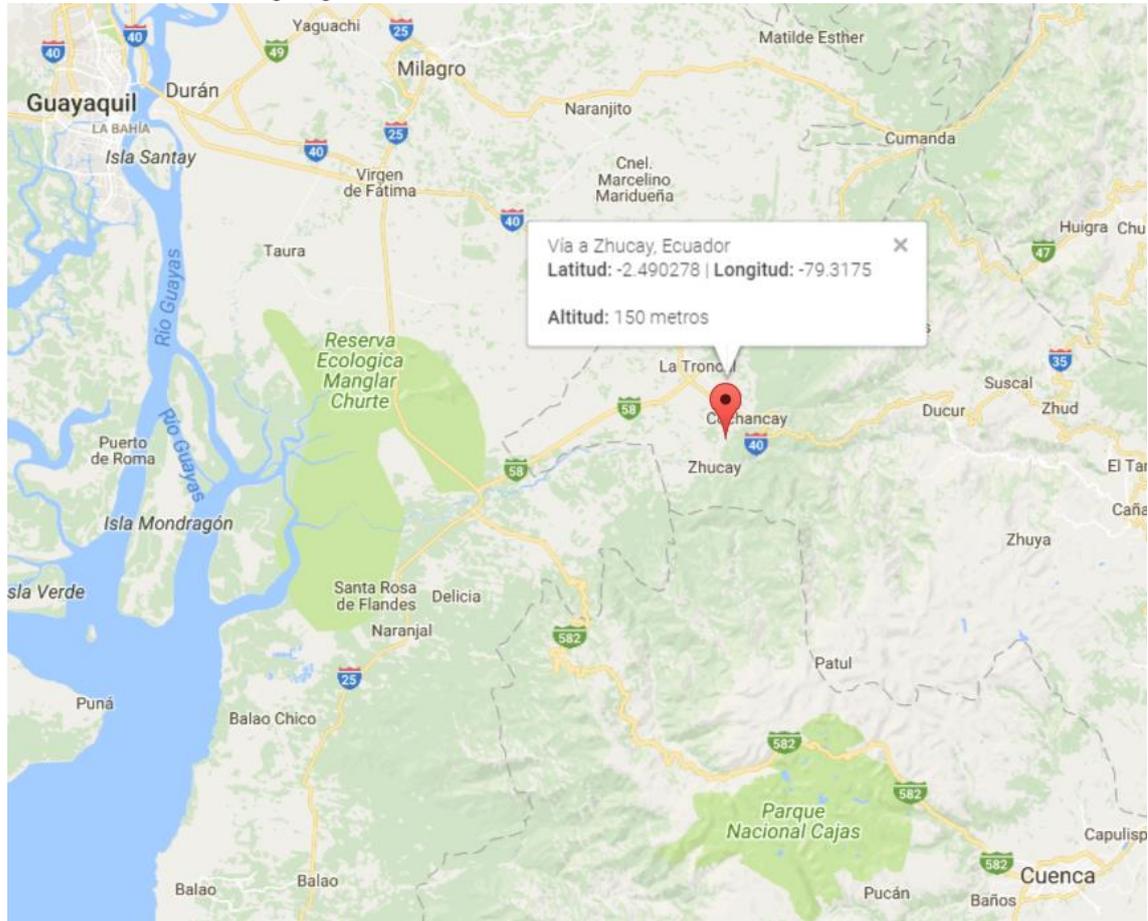
- Quirós, M. B. (2006). *Principios Y Aplicaciones de la Cromatografía de Gases* (Vol. 10). Editorial Universidad de Costa Rica.
- Quizhpi, E. (2016). Caracterización del mucílago de Cacao CCN-51 mediante Espectrofotometría Uv-Visible y Absorción Atómica. Caso: Ecuador-Zona 6., 92.
- Ramos, S., & Martínez, J. (2014). *Estandarización de una técnica cuantitativa para determinar etanol en una muestra problema por microdifusión y espectrofotometría*. Guanajuato.
- Sánchez, Ó. J., & Cardona, C. A. (2005). Producción biotecnológica de alcohol carburante I: obtención a partir de diferentes materias primas. *Interciencia*, 30(11).
- Schuller, D., & Casal, M. (2006). Utilización de cepas genéticamente modificadas de *Saccharomyces Cerevisiae* en enología. *Infowine*, 1–13. Retrieved from http://www.infowine.com/es/art_culos_tecnicos/utilizaci_n_de_cepas_geneticamente_modificadas_de_saccharomyces_cerevisiae_en_enolog_a_sc_3120.htm#
- Serna, F., Barrera, L., & Montiel, H. (2011). Impacto Social y Económico en el Uso de Biocombustibles. *Journal of Technology Management & Innovation*, 6(1), 100–114. <https://doi.org/0718-2724>
- Suárez, C., Garrido, N., & Guevara, C. (2016). Levadura *Saccharomyces cerevisiae* y la producción de alcohol. Revisión bibliográfica. *ICIDCA. Sobre Los Derivados de La Caña de Azúcar*, 50(1), 20–28.
- Toala, G. C., Astudillo, J. I., & Tobalina, C. (2009). Proyecto de implementación de una planta productora de etanol en base a la caña de azúcar, en la península de Santa Elena, provincia del Guayas.
- Ulloa, J., & Rodríguez, J. (2010). El modelo logístico: Una alternativa para el estudio del crecimiento poblacional de organismos The logistic model: an alternative for the study of organisms growth population, 11(3). Retrieved from <http://www.veterinaria.org/revistas/redvet/n030310/031004.pdf%5Cnhttp://www.veterinaria.org/revistas/redvet%5Cnhttp://www.veterinaria.org/revistas/redvet/n030310.html>
- Vallejo, J. (2014). Ecuador, entre los cinco mayores productores de cacao del mundo. *El Ciudadano*.
- Vázquez, H., & Dacosta, O. (2007). Fermentación alcohólica: Una opción para la producción de energía renovable a partir de desechos agrícolas. *Ingeniería, Investigación Y Tecnología*, 2007, 249–259. Retrieved from http://www.scielo.org.mx/scielo.php?pid=S1405-77432007000400004&script=sci_arttext&lng=pt
- Vela, V., Rodríguez, M., Hernández, M., & Valdez, V. (2004). Propuesta de un método económico para la cuantificación de alcohol etílico. *Asociación Mexicana de Bioquímica Clínica*, 29, 2.
- Vera-Chang, J., Cabrera-Verdezoto, R., Morán-Morán, J., Neira-Rengifo, K., Haz-Burgos, R., Vera-Barahona, J., ... Cabrera-Verdesoto, C. (2016). Evaluación de tres métodos de polinización artificial en clones de cacao (*Theobroma cacao* L.) CCN-51. *Idesia (Arica)*, 34(6), 35–40. <https://doi.org/10.4067/S0718-34292016005000033>
- Zahed, O., Jouzani, G. S., Abbasalizadeh, S., Khodaiyan, F., & Tabatabaei, M. (2016). Continuous co-production of ethanol and xylitol from rice straw hydrolysate in a



membrane bioreactor. *Folia Microbiologica*, 61(3), 179–189.
<https://doi.org/10.1007/s12223-015-0420-0>

ANEXOS

Anexo 1 Ubicación geográfica de la zona de cosecha de cacao CCN-51



Fuente: Google maps

Elaboración: Autor

Anexo 2 Preparación de reactivos.**Ácido sulfúrico H₂SO₄ (10 N)**H₂SO₄ PM= 98P_{eq}=49

49g equivale a 1N en 1000ml

490g equivale a 10N en 1000ml

245g equivale a 10N en 500ml

Riqueza ácido sulfúrico R = 98%

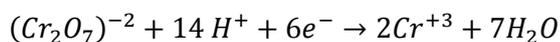
245g de ácido 100% de riqueza

X g de ácido 98% de riqueza

250 g de ácido en 500 ml para obtener una solución 10 N

 $d=m/V \rightarrow V = m/d$ densidad ácido sulfúrico $d = 1,84\text{g/ml}$ $V = 250(\text{g}) \text{ de ácido} / 1,84(\text{g/ml})$ $V = 135,86 \text{ ml}$

Se debe medir 135,86 ml de ácido sulfúrico $d=1,84\text{g/ml}$ y $R= 98\%$ aforar en balón de 500 ml con agua destilada para obtener una solución 10 N. adicionar el H₂SO₄ sobre el agua lentamente.

Dicromato de potasio, K₂Cr₂O₇ (0,4N) en ácido sulfúrico H₂SO₄ (10 N)K₂Cr₂O₇ PM= 249,2P_{eq}=PM/# de electronesP_{eq}= 249,2/6P_{eq}= 49,03

49,03g equivale a 1N en 1000ml

24,51g equivale a 1N en 500ml

9,806g equivale a 0,4N en 500ml



Se debe pesar 9,807 g de $K_2Cr_2O_7$, pulverizado y seco (estufa $100^\circ C$, 5 a 6 horas), disolver con H_2SO_4 (10 N) y aforar en un balón de 500 ml con el ácido.

Tiosulfato de sodio, $Na_2S_2O_3$ (0,1N)

$Na_2S_2O_3 \cdot 5H_2O$ PM= 248,2

Peq = 248,2

248,2g equivale a 1N en 1000ml

24,82g equivale a 0,1N en 1000ml

Se debe pesar 24,818 g de $Na_2S_2O_3 \cdot 5H_2O$ y aforar en un balón de 1000 ml con agua destilada. Es importante mantener estéril los materiales con los que entra en contacto el tiosulfato ya que este se degrada por acción bacteriana a tiosulfito, como medida de precaución se puede agregar 1ml/L de solución a preparar de alcohol amílico.

Ioduro de Potasio, KI, (3N)

KI PM= 166

Peq = 166

166g equivale a 1N en 1000ml

16,6g equivale a 1N en 100ml

49,8g equivale a 3N en 100ml

Se debe pesar 49,8 g de yoduro de potasio, disolver y aforar en un balón de 100 ml. Se debe almacenar este reactivo en un frasco ámbar. Este reactivo no se debe usar si es que ha cambiado su coloración.

Indicador de Almidón

Pesar 1 g de almidón soluble, disolver en agua destilada fría, verter el contenido en 200 ml de agua destilada en ebullición, agitar hasta obtener un líquido ligero y translucido, dejar decantar y emplear únicamente el líquido sobrenadante.

Anexo 3 Flujo grama método de mínimos cuadrados no lineales de Levenberg-Marquardt.

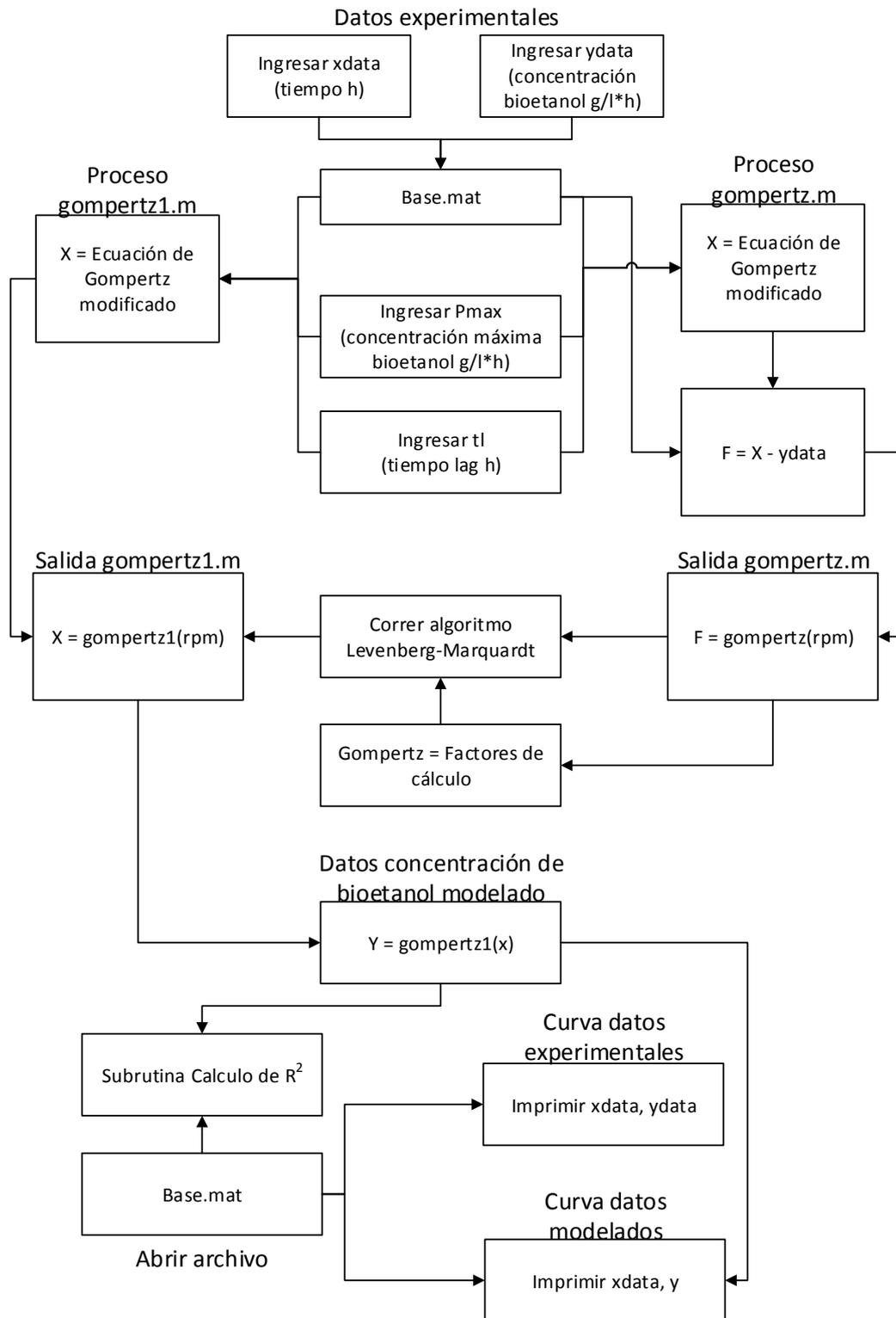


Ilustración 13 Flujo grama método de mínimos cuadrados no lineales de Levenberg-Marquardt.
Elaboración: Autor.

Anexo 4 Resultados experimentales y del modelado Experimento 1.

Tabla 19 Resultados experimento 1.

Muestra	Tiempo (h)	Promedio de volumen gastado de titulante (ml)	Concentración de bioetanol en la muestra (g/L)	Brix	Modelado de la ecuación de Gompertz (g/L)
Blanco	0,0	6,633	0	17,0	0,899339135
1	6,0	6,517	3,357083333	16,5	2,382286481
2	12,0	6,300	9,591666667	15,5	4,639416821
3	18,0	6,317	9,112083333	15	7,320175455
4	24,0	6,217	11,98958333	14,5	10,00080554
5	32,5	6,233	11,51	13,5	13,24756403
6	48,0	6,167	13,42833333	12,5	16,95508433
7	56,5	6,083	15,82625	11	18,03264874
8	70,5	5,967	19,18333333	10	18,97326318
9	80,5	5,950	19,66291667	9	19,29345876
10	95,5	5,967	19,18333333	7,5	19,51901753
11	104,5	5,967	19,18333333	7,5	19,58134587

Elaboración: Autor.

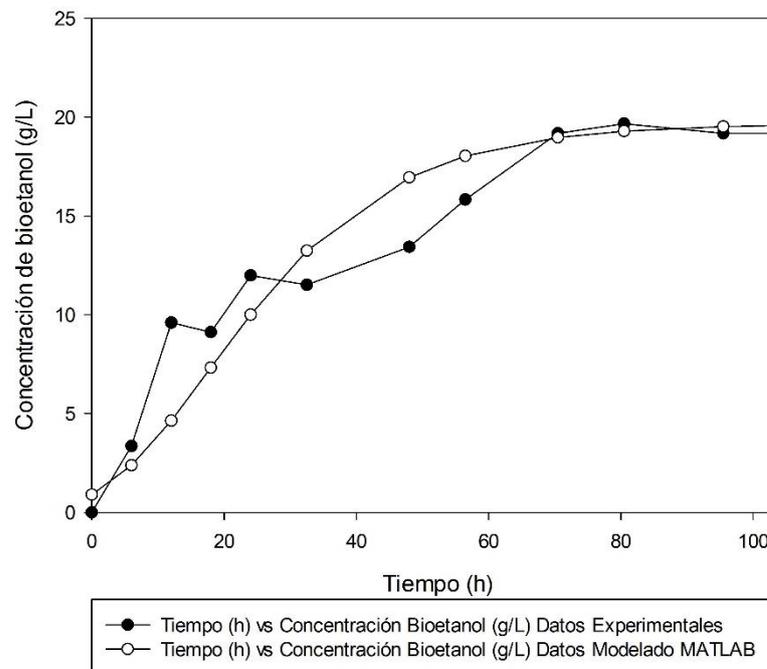


Ilustración 14 Resultados experimentales y modelado de la ecuación de Gompertz modificado experimento 1.

Elaboración: Autor.

Tabla 20 Resultados modelado en MATLAB R2014a ecuación de Gompertz modificado experimento 1.

Resultados Modelado MATLAB R2014a		
Parámetro	Valor	Unidades
R ²	0,8816	-
r _{pm}	0,4575	g/(L*h)

Elaboración: Autor.

Anexo 5 Resultados experimentales y del modelado Experimento 2.

Tabla 21 Resultados del experimento 2.

Muestra	Tiempo (h)	Promedio de volumen gastado de titulante (ml)	Concentración de bioetanol en la muestra (g/L)	Brix	Modelado de la ecuación de Gompertz (g/L)
Blanco	0,0	6,317	0	17,0	0,885279185
1	6,0	6,267	1,43875	15	2,574505077
2	12,0	6,133	5,275416667	14	5,198995745
3	18,0	5,967	10,07125	13	8,257880639
4	24,0	6,050	7,673333333	11,5	11,19865755
5	30,0	5,833	13,90791667	10,5	13,68565469
6	44,5	5,650	19,18333333	7	17,49807054
7	54,0	5,617	20,1425	6	18,73180421
8	69,0	5,633	19,66291667	6	19,63465151

Elaboración: Autor.

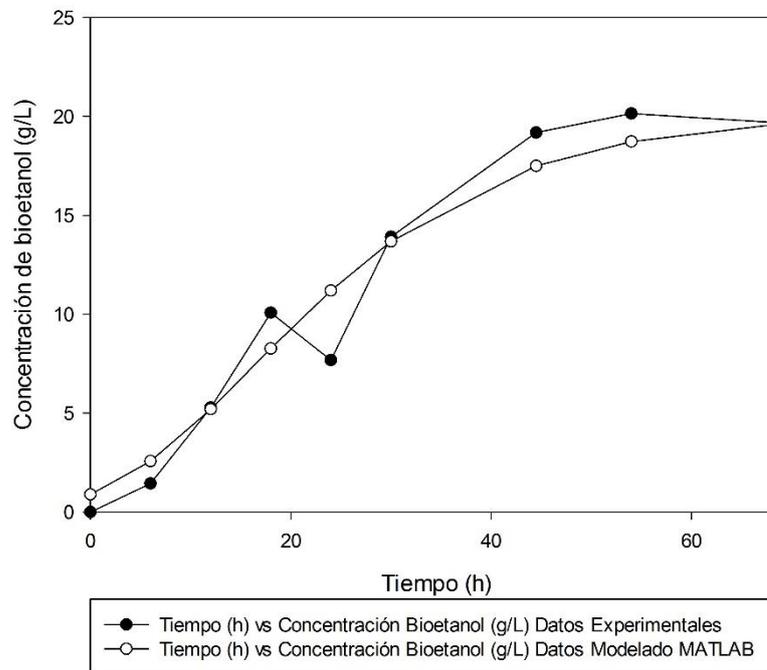


Ilustración 15 Resultados experimentales y modelado de la ecuación de Gompertz modificado.

Experimento 2.

Elaboración: Autor.

Tabla 22 Resultados modelado en MATLAB R2014a ecuación de Gompertz modificado experimento 2.

Resultados Modelado MATLAB R2014a		
Parámetro	Valor	Unidades
R ²	0,9538	-
r _{pm}	0,5162	g/(L*h)

Elaboración: Autor.

Anexo 6 Resultados experimentales y del modelado Experimento 3.

Tabla 23 Resultados del experimento 3.

Muestra	Tiempo (h)	Promedio de volumen gastado de titulante (ml)	Concentración de bioetanol en la muestra (g/L)	Brix	Modelado de la ecuación de Gompertz (g/L)
Blanco	0,0	4,167	0	17,0	0,475368517
1	6,0	3,917	5,755	16,5	3,195413018
2	11,0	3,800	8,440666667	15	6,915691455
3	18,0	3,767	9,208	13,5	11,45578697
4	24,0	3,600	13,04466667	12,5	13,77709953
5	29,5	3,483	15,73033333	12,5	14,92320992
6	31,5	3,483	15,73033333	10	15,18729935
7	47,0	3,467	16,114	7,5	15,98668263

Elaboración: Autor.

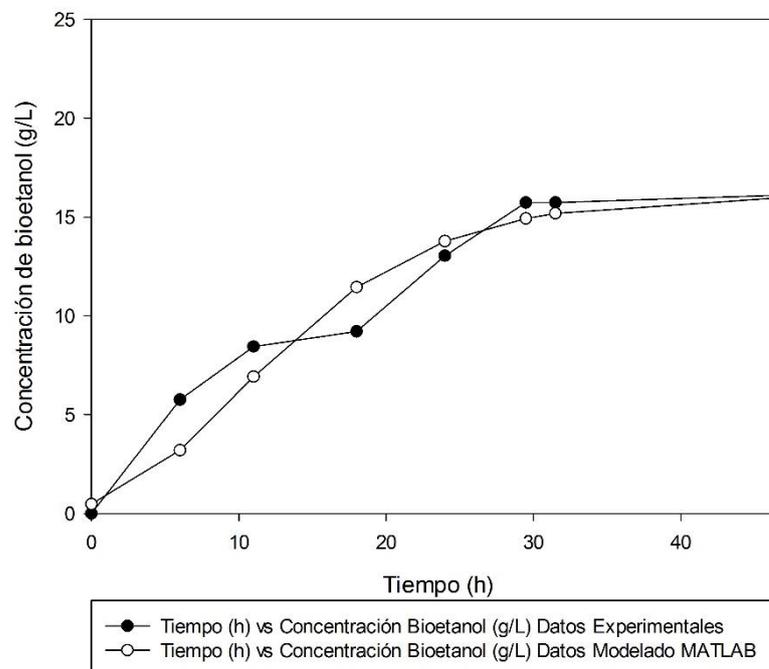


Ilustración 16 Resultados experimentales y modelado de la ecuación de Gompertz modificado experimento 3.

Elaboración: Autor.

Tabla 24 Resultados modelado en MATLAB R2014a ecuación de Gompertz modificado experimento 3.

Resultados Modelado MATLAB R2014a		
Parámetro	Valor	Unidades
R ²	0,9323	-
r _{pm}	0,7689	g/(L*h)

Elaboración: Autor.

Anexo 7 Resultados experimentales y del modelado Experimento 4.

Tabla 25 Resultados experimento 4.

Muestra	Tiempo (h)	Promedio de volumen gastado de titulante (ml)	Concentración de bioetanol en la muestra (g/L)	Brix	Modelado de la ecuación de Gompertz (g/L)
Blanco	0,0	6,300	0	17,0	0,526195093
1	6,0	6,050	7,19375	15,5	4,249045535
2	12,0	5,900	11,51	14	10,28305904
3	18,0	5,833	13,42833333	12,5	14,94613313
4	24,0	5,717	16,78541667	11,5	17,50839267
5	30,0	5,667	18,22416667	10	18,72069606
6	32,5	5,667	18,22416667	8	18,99962946
7	46,5	5,617	19,66291667	6	19,57243818
8	56,5	5,633	19,18333333	6	19,64130209
9	71,5	5,650	18,70375	6	19,66039832

Elaboración: Autor.

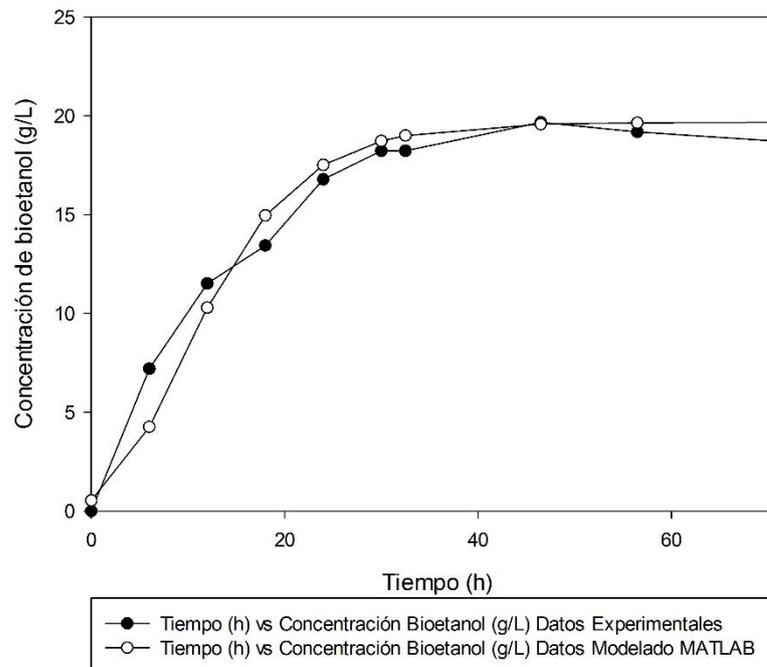


Ilustración 17 Resultados experimentales y modelado de la ecuación de Gompertz modificado experimento 4.

Elaboración: Autor.

Tabla 26 Resultados modelado en MATLAB R2014a ecuación de Gompertz modificado experimento 4.

Resultados Modelado MATLAB R2014a		
Parámetro	Valor	Unidades
R ²	0,959	-
r _{pm}	1,0369	g/(L*h)

Elaboración: Autor.

Anexo 8 Resultados experimentales y del modelado Experimento 5.

Tabla 27 Resultados experimento 5.

Muestra	Tiempo (h)	Promedio de volumen gastado de titulante (ml)	Concentración de bioetanol en la muestra (g/L)	Brix	Modelado de la ecuación de Gompertz (g/L)
Blanco	0,0	6,300	0	17,0	0,924380829
1	6,0	6,117	5,275416667	16	2,708823069
2	12,0	5,950	10,07125	15	5,485522657
3	18,0	5,850	12,94875	14,5	8,716200692
4	24,0	5,833	13,42833333	13,5	11,81167512
5	30,0	5,833	13,42833333	12,5	14,41884062
6	31,7	5,850	12,94875	12	15,06774083
7	45,8	5,817	13,90791667	10,5	18,60242611
8	55,7	5,717	16,78541667	9,5	19,82361566
9	71,3	5,600	20,1425	7,5	20,6621604
10	79,7	5,567	21,10166667	6	20,85850727
11	96,0	5,567	21,10166667	6	21,02364403

Elaboración: Autor.

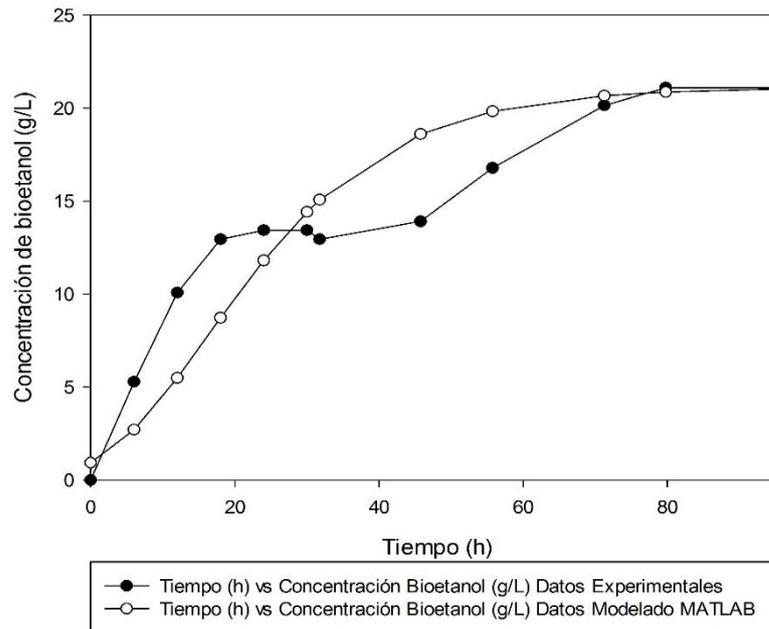


Ilustración 18 Resultados experimentales y modelado de la ecuación de Gompertz modificado experimento 5.

Elaboración: Autor.

Tabla 28 Resultados modelado en MATLAB R2014a ecuación de Gompertz modificado experimento 5.

Resultados Modelado MATLAB R2014a		
Parámetro	Valor	Unidades
R ²	0,8011	-
r _{pm}	0,5449	g/(L*h)

Elaboración: Autor.

Anexo 9 Resultados experimentales y del modelado Experimento 6.

Tabla 29 Resultados experimento 6.

Muestra	Tiempo (h)	Promedio de volumen gastado de titulante (ml)	Concentración de bioetanol en la muestra (g/L)	Brix	Modelado de la ecuación de Gompertz (g/L)
Blanco	0,0	6,25	0	17,0	0,521647471
1	6,0	5,85	11,51	15,0	5,266421216
2	12,0	5,8166	12,4691	12,0	12,75382134
3	19,0	5,7	15,8262	10,0	18,45255013
4	21,5	5,55	20,1425	9,0	19,57257881
5	25,5	5,5833	19,1833	7,5	20,71253347
6	30,0	5,5166	21,1016	6,5	21,39437223
7	34,0	5,4833	22,0608	6,0	21,70707952
8	47,5	5,5	21,5812	6,0	22,01982606
9	59,0	5,5166	21,1016	6,0	22,05432422

Elaboración: Autor.

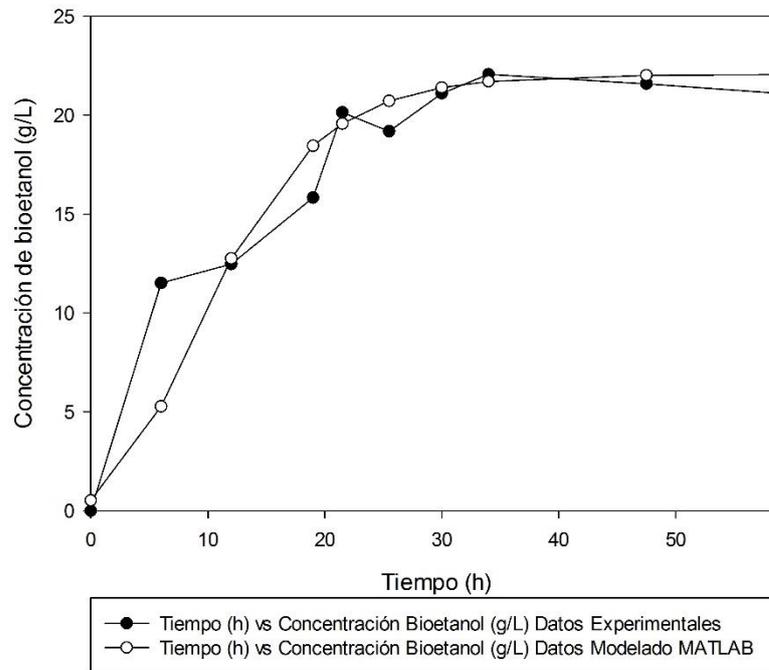


Ilustración 19 Resultados experimentales y modelado de la ecuación de Gompertz modificado experimento 6.

Elaboración: Autor.

Tabla 30 Resultados modelado en MATLAB R2014a ecuación de Gompertz modificado experimento 6.

Resultados Modelado MATLAB		
Parámetro	Valor	Unidades
R ²	0,8842	-
r _{pm}	1,2998	g/(L*h)

Elaboración: Autor.

Anexo 10 Resultados experimentales y del modelado Experimento 7.

Tabla 31 Resultados experimento 7.

Muestra	Tiempo (h)	Promedio de volumen gastado de titulante (ml)	Concentración de bioetanol en la muestra (g/L)	Brix	Modelado de la ecuación de Gompertz (g/L)
Blanco	0,0	6,317	0	17,0	0,707744295
1	6,0	6,133	5,275416667	15,0	2,118532181
2	12,0	6,100	6,234583333	14,0	4,322992365
3	18,0	6,100	6,234583333	13,0	6,875143608
4	24,0	6,050	7,673333333	12,0	9,297351098
5	32,8	5,867	12,94875	10,5	12,0786203
6	48,0	5,800	14,86708333	8	14,74523151
7	56,8	5,783	15,34666667	7,5	15,4527196
8	70,8	5,783	15,34666667	7,5	15,9876902
9	80,8	5,775	15,58645833	7	16,14967296
10	96,0	5,750	16,30583333	7	16,25331336
11	104,8	5,750	16,30583333	7	16,27775833

Elaboración: Autor.

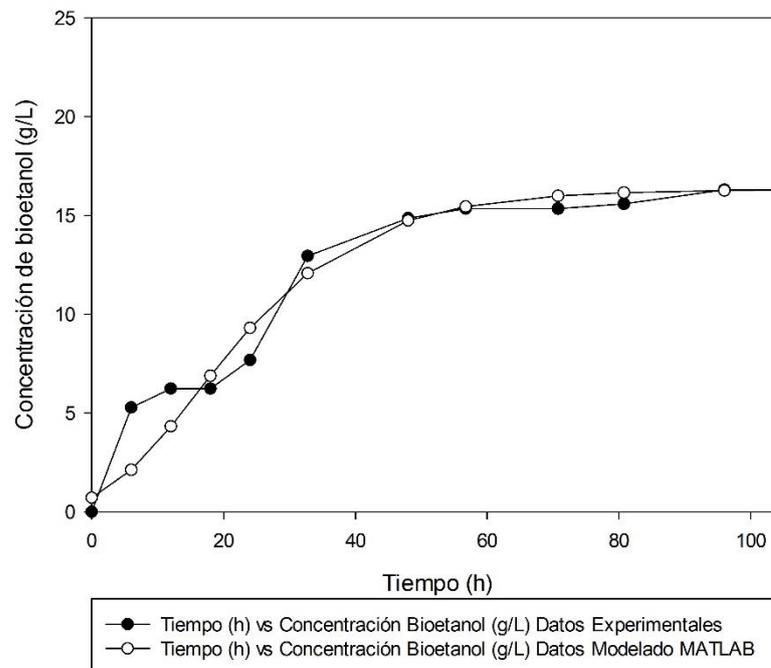


Ilustración 20 Resultados experimentales y modelado de la ecuación de Gompertz modificado experimento 7.

Elaboración: Autor.

Tabla 32 Resultados modelado en MATLAB R2014a ecuación de Gompertz modificado experimento 7.

Resultados Modelado MATLAB R2014a		
Parámetro	Valor	Unidades
R ²	0,9457	-
r _{pm}	0,4299	g/(L*h)

Elaboración: Autor.

Anexo 11 Resultados experimentales y del modelado Experimento 8.

Tabla 33 Resultados experimento 8.

Muestra	Tiempo (h)	Promedio de volumen gastado de titulante (ml)	Concentración de bioetanol en la muestra (g/L)	Brix	Modelado de la ecuación de Gompertz (g/L)
Blanco	0,0	6,267	0	17,0	0,680806681
1	6,0	6,150	3,357083333	14,0	2,840510059
2	12,0	6,017	7,19375	12,5	6,370691805
3	18,0	5,883	11,03041667	10,5	10,05868718
4	24,0	5,850	11,98958333	8,5	13,022704
5	30,0	5,767	14,3875	6,5	15,07030628
6	44,3	5,633	18,22416667	6	17,35835296
7	54,3	5,700	16,30583333	6	17,88438828
8	68,3	5,700	16,30583333	6	18,13370783

Elaboración: Autor.

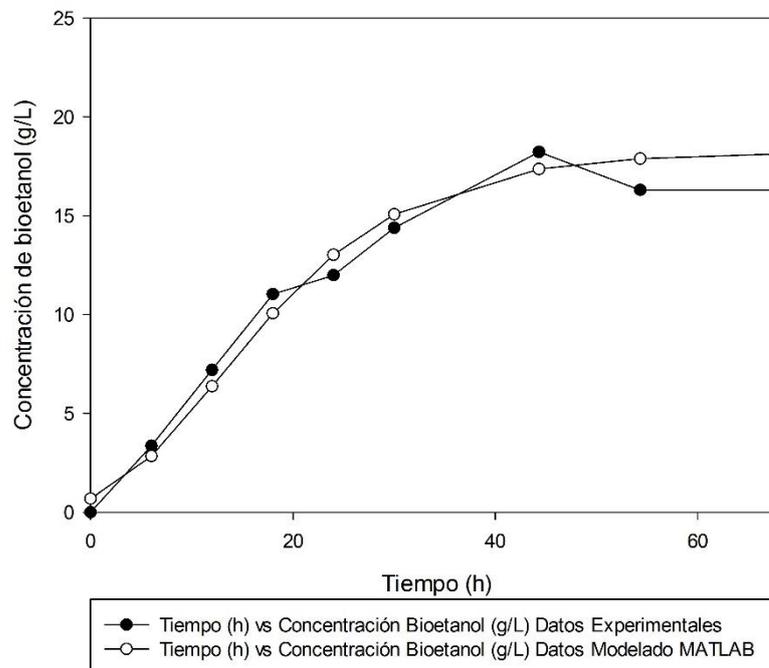


Ilustración 21 Resultados experimentales y modelado de la ecuación de Gompertz modificado experimento 8.

Elaboración: Autor.

Tabla 34 Resultados modelado en MATLAB R2014a ecuación de Gompertz modificado experimento 8.

Resultados Modelado MATLAB		
Parámetro	Valor	Unidades
R ²	0,9668	-
r _{pm}	0,6371	g/(L*h)

Elaboración: Autor.

Anexo 12 Resultados experimentales y del modelado Experimento 9-1.

Tabla 35 Resultados experimento 9-1.

Muestra	Tiempo (h)	Promedio de volumen gastado de titulante (ml)	Concentración de bioetanol en la muestra (g/L)	Brix	Modelado de la ecuación de Gompertz (g/L)
Blanco	0,0	6,233	0	17,0	0,75414353
1	6,0	6,167	1,918333333	15,0	2,8185352
2	12,0	6,000	6,714166667	14,0	6,156528329
3	18,0	5,867	10,55083333	12,5	9,781760403
4	24,0	5,767	13,42833333	11,5	12,87005578
5	30,0	5,700	15,34666667	10,5	15,14252433
6	32,8	5,717	14,86708333	9,5	15,92580568
7	48,0	5,683	15,82625	7,5	18,2618485
8	56,8	5,567	19,18333333	6,5	18,74803738
9	72,0	5,567	19,18333333	6,5	19,06721452
10	80,8	5,583	18,70375	6,5	19,12910441

Elaboración: Autor.

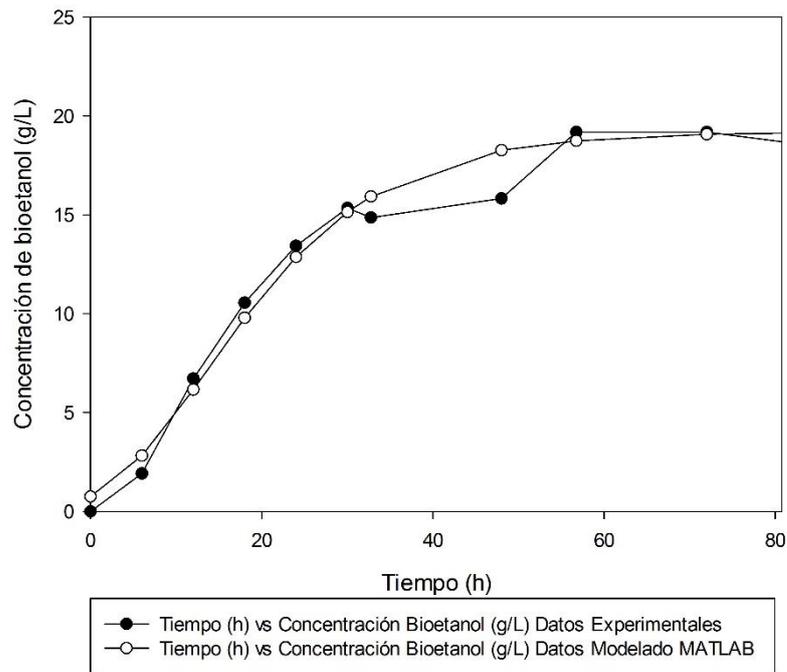


Ilustración 22 Resultados experimentales y modelado de la ecuación de Gompertz modificado experimento 9-1.

Elaboración: Autor.

Tabla 36 Resultados modelado en MATLAB R2014a ecuación de Gompertz modificado experimento 9-1.

Resultados Modelado MATLAB R2014a		
Parámetro	Valor	Unidades
R ²	0,9798	-
r _{pm}	0,6154	g/(L*h)

Elaboración: Autor.

Anexo 13 Resultados experimentales y del modelado Experimento 9-2.

Tabla 37 Resultados experimento 9-2.

Muestra	Tiempo (h)	Promedio de volumen gastado de titulante (ml)	Concentración de bioetanol en la muestra (g/L)	Brix	Modelado de la ecuación de Gompertz (g/L)
Blanco	0,0	6,450	0	17,0	0,711213047
1	6,0	6,333	3,357083333	15,0	3,015729272
2	12,0	6,200	7,19375	14,0	6,787393023
3	18,0	6,100	10,07125	13	10,70390122
4	24,0	6,000	12,94875	11,5	13,82413939
5	31,0	5,850	17,265	10,5	16,23118906
6	46,0	5,783	19,18333333	8,5	18,44059009
7	55,0	5,783	19,18333333	7,5	18,86720646
8	70,0	5,783	19,18333333	7,5	19,10815751
9	79,0	5,783	19,18333333	7,5	19,15166309

Elaboración: Autor.

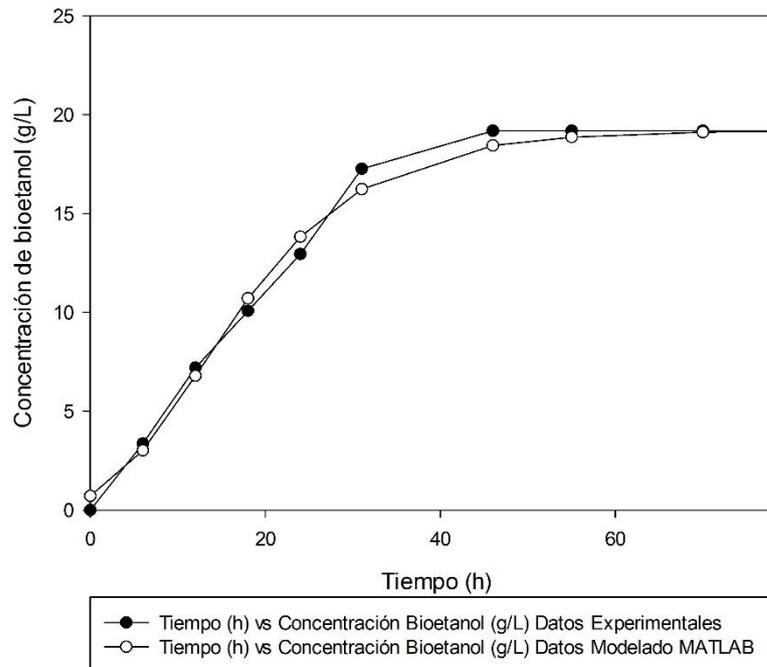


Ilustración 23 Resultados experimentales y modelado de la ecuación de Gompertz modificado experimento 9-2.

Elaboración: Autor.

Tabla 38 Resultados modelado en MATLAB R2014a ecuación de Gompertz modificado experimento 9-2.

Resultados Modelado MATLAB R2014a		
Parámetro	Valor	Unidades
R2	0,9922	-
rpm	0,6787	g/(L*h)

Elaboración: Autor.

Anexo 14 Fotografías de la investigación.



Cosecha del cacao



Lavado de mazorcas



Cortado de mazorcas y extracción de pepas



Ablandamiento en mezcladora de paletas



Fluidización y extracción de mucílago



Pasteurización de mucílago



Esterilización de envases plásticos



Evacuado y sellado de envases con mucílago



Birreactor BiotronGX en funcionamiento



Centrifuga 4000 rpm



Tubo con muestra luego de la centrifugación



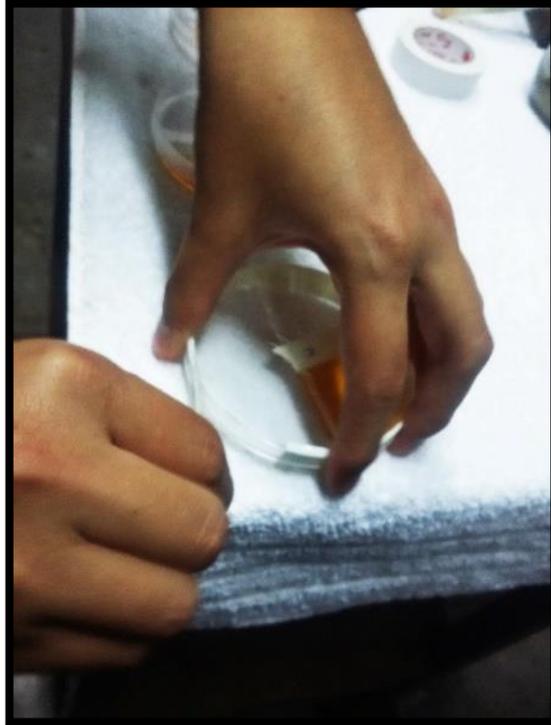
Extracción de sobrenadante



Dilución en agua destilada 1:100



Dosificación de reactivos en cajas bipetri



Cerrado hermético de la caja bipetri



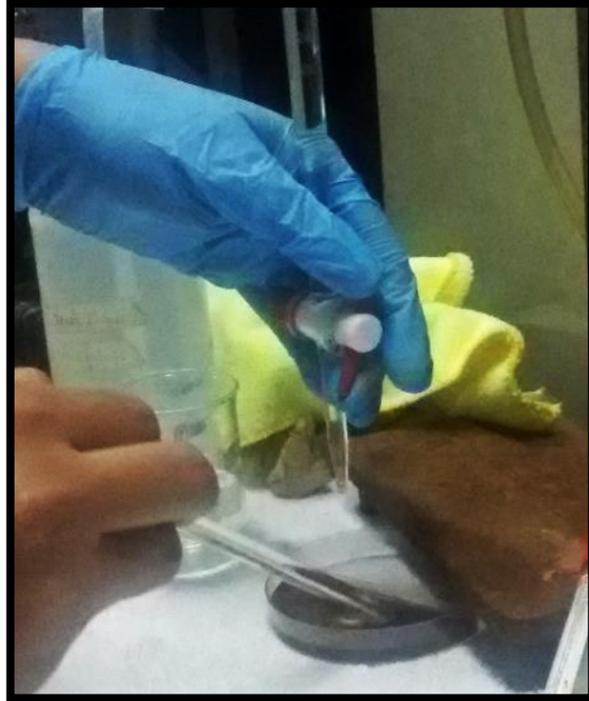
Microdifusión en secador a 115°F



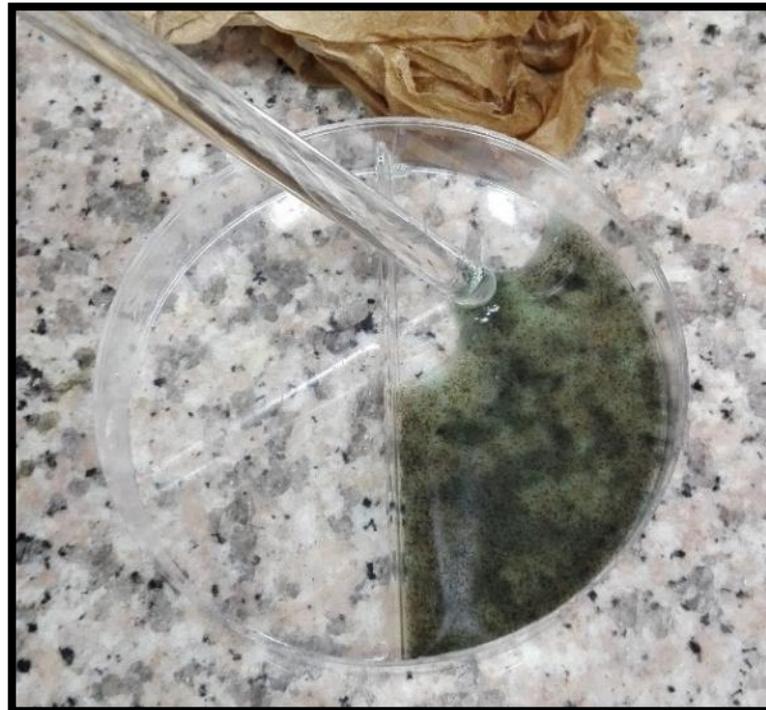
Caja bipetri con muestra antes de la titulación



Caja bipetri con muestra con adición de KI 3N e indicador



Titulación de muestra con $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 0,1 N



Caja bipetri con muestra durante la titulación



Caja bipetri con muestra al final la titulación