

UNIVERSIDAD DE CUENCA



Facultad de Ciencias Químicas

Carrera de Ingeniería Química

“Determinación de los parámetros cinéticos como: la velocidad máxima de reacción y la constante de crecimiento en el proceso fermentativo del mucílago de cacao CCN-51 caso Ecuador, Zona 6”

Trabajo de titulación previo a la obtención del título de Ingeniera Química.

Autoras:

Ana Isabel Alvarado López

C.I: 0105355127

Mónica Elizabeth Valdez Arcentales

C.I: 0302943949

Director:

Mgst. Jorge Washington Delgado Noboa

C.I: 0103599411

Cuenca – Ecuador

03/04/2019



RESUMEN

En el presente trabajo de titulación, el objetivo primordial es la obtención y análisis de los parámetros cinéticos de la ecuación de Monod: velocidad máxima de reacción (μ_{max}) y la constante de crecimiento (K_S) a partir de los modelos matemático de Lineweaver – Burk, Eadie Hofstee y Hanes Woolf aplicados al proceso fermentativo del mucílago de cacao CCN – 51, manteniendo constante la cantidad de 3g/l de levadura *Sacchromyces Cerevisiae* y variando la concentración inicial de °Brix, trabajando con 8,5; 17; 21 y 24 °Brix. La experimentación se desarrolló en el bioreactor Bath Biotron GX Single Vessel manteniendo parámetros de pH=4 y temperatura=35°C. La cuantificación de la biomasa generada se realizó por medio del método gravimétrico Peso Seco y Liofilización, y se aplicó el método Fenol-Ácido Sulfúrico (Dubois) para cuantificar la cantidad de sustrato consumido.

Las variables de manipulación de mayor preponderancia son velocidad de reacción que se obtiene a partir de biomasa final e inicial y el consumo de sustrato; a partir de las mencionadas variables se obtienen los gráficos para los diferentes modelos de linealización que se manipulan en función de su aplicabilidad. Los datos obtenidos de K_S y μ_{max} en el estudio realizado son: 47,689 (g/l) y 0,1202 (h^{-1}) respectivamente, los mismos que se obtuvieron por medio de los métodos de regresión lineal propuestos, comprobando que el método de mayor ajuste lineal es el de Hanes Woolf dando como coeficiente de correlación lineal 0,9937. Los resultados alcanzados se contrastaron con los obtenidos en investigaciones previas por programación en el software Matlab Versión 8.3 .

Palabras clave: Mucílago de cacao. Fermentación discontinua. Biomasa. Sustrato. Regresión lineal. Velocidad máxima de reacción. Constante de crecimiento.



ABSTRACT

In the present work of qualification, the primary objective is the obtaining and analysis of kinetic parameters of the equation of Monod: maximum specific growth rate (μ_{max}) and Monod constant (K_S) from the mathematical models of Lineweaver - Burk, Eadie Hofstee and Hanes Woolf of cocoa CCN - 51, mucilage fermentation processes applied to the fermentation process of the mucilage of cocoa CCN - 51, keeping constant the amount of 3 g/l yeast *Sacchromyces Cerevisiae* and varying the initial concentration of ° Brix, working with 8.5; 17; 21 and 24 ° Brix. Experimentation developed in the bioreactor Bath Biotron GX Single Vessel with parameters of pH = 4 and temperature = 35° C. The generated biomass quantification was carried out through the gravimetric method weight dry and lyophilization, and applied the phenol - sulfuric acid (Dubois) method to quantify the amount of substrate consumed.

Manipulation of greater preponderance variables are specific growth rate (μ) obtained from initial and final biomass and substrate consumption; from the mentioned variables graphics obtained for different models of linear regression are handled according to their applicability. The data obtained of K_S y μ_{max} in the study are: 47,6889 (g/l) y 0,1202 (h^{-1}) respectively, those were obtained through linear regression methods proposed, checking the major method to adjust linear is the Hanes-Woolf resulting coefficient of linear correlation 0,9937. The results obtained were compared with those obtained in previous investigations by programming in the software Matlab Version 8.3

Keywords: Mucilage of cocoa. Batch fermentation. Biomass. Substrate. Linear regression. Maximum specific growth rate. Monod constant.



INDICE DE CONTENIDO

RESUMEN 2

ABSTRACT 3

AGRADECIMIENTOS 15

DEDICATORIAS 17

INDICE DE CONTENIDO 4

ÍNDICE DE TABLAS..... 7

ÍNDICE DE ECUACIONES..... 8

ÍNDICE DE ILUSTRACIONES..... 9

CAPITULO 1: INTRODUCCIÓN..... 19

 1.1 Objetivo General y Específicos 21

 1.1.1 Objetivo General 21

 1.1.2 Objetivos Específicos 21

CAPÍTULO 2: CONTENIDO TEÓRICO..... 22

 2.1 Generalidades del cacao..... 22

 2.1.1 Historia del cacao..... 23

 2.1.2 Cacao en el Ecuador 24

 2.2 Mucílago de cacao 25

 2.2.1 Características físico químicas del mucílago de cacao CCN – 51 zona 6 26

 2.3 Levadura 26

 2.3.1 Composición de la levadura 27

 2.3.2 Requerimiento nutricional 27

 2.3.3 Levadura “*Saccharomyces Cerevisiae*” 28

 2.3.4 Cinética de crecimiento de la levadura..... 28

 2.3.5 Influencias del entorno 29

 2.4 Fermentación 31

 2.4.1 Tipos de fermentación..... 31

 2.4.2 Glucólisis para producción de etanol en medio anaerobio 32

 2.4.3 Factores que influyen en el proceso fermentativo 34

 2.4.4 Cinética de fermentación 35

 2.4.5 Cinética de consumo de sustrato 35

 2.5 Generación de Biomasa 36

 2.6 Modelos cinéticos de la fermentación 37

 2.6.1 Cinética de Monod 37



Universidad de Cuenca

2.7 Parámetros cinéticos	38
2.7.1 Velocidad máxima de reacción (u_{max}).....	38
2.7.2 Constante de crecimiento (K_s)	39
2.8 Métodos de análisis cinéticos para la determinación de K_s y U_{max}	40
2.8.1 Modelos de análisis cinético por ajuste de regresión lineal	40
2.9 Cuantificación de biomasa y consumo de sustrato	43
2.9.1 Método peso seco.....	43
2.9.2 Espectroscopía UV- Visible	43
CAPÍTULO 3: METODOLOGÍA	45
3.1 Materia Prima.....	45
3.1.1 Mucílago de cacao.....	45
3.1.2 Levadura.....	46
3.1.3 Azúcar	46
3.2 Métodos	46
3.2.1 Extracción del mucílago de cacao.....	46
3.2.2 Determinación de la concentración de azúcares en el mucílago de cacao.....	48
3.2.3 Fermentación Discontinua.....	49
3.2.4 Métodos para cuantificación de biomasa.....	53
3.2.5 Fundamento del método fenol - ácido sulfúrico (Método de DuBois).....	58
3.3 Modelos matemáticos.....	62
Lineaweaver – Burk.....	63
4: ANÁLISIS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS	64
4.1 Parámetros para el proceso fermentativo	64
4.2 Análisis y resultados de la cuantificación de sustrato en el transcurso de la fermentación anaerobia con levadura <i>S. Cerevisiae</i>	64
4.3 Análisis y resultados de la cuantificación de biomasa en el transcurso de la fermentación anaerobia con levadura <i>S. Cerevisiae</i>	70
4.4 Análisis y resultados de los métodos por regresión lineal.....	71
4.4.1 Análisis del método Lineaweaver – Burk	72
4.4.2 Análisis del método Eadie Hofstee.....	73
4.4.3 Análisis del método Hanes Woolf.....	75
4.5 Discusión de los modelos matemáticos.....	76
CAPÍTULO 5: CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....	80
BIBLIOGRAFÍA.....	83
ANEXOS.....	89



Universidad de Cuenca

Anexo I. Datos y resultados de sustrato en el experimento a 8,5 °Brix	89
Anexo II. Datos y resultados de sustrato en el experimento a 17 °Brix	89
Anexo III. Datos y resultados de sustrato en el experimento a 21 °Brix	90
Anexo IV. Datos y resultados de sustrato en el experimento a 24 °Brix.....	90
Anexo V. Imágenes de la recolección del cacao CCN – 51 sector Zhucay ...	91
Anexo VI. Imágenes de extracción del mucílago de cacao CCN – 51.....	92
Anexo VII. Imágenes de preparación del bioreactor para el proceso fermentativo	96
Anexo VII. Imágenes del método gravimétrico peso seco, para la cuantificación de biomasa	98
Anexo VIII. Imágenes del método de liofilización, para la cuantificación de biomasa	99
Anexo IX. Imágenes del método Fenol – ácido sulfúrico, para la cuantificación de sustrato	101



ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Características físico - químicas del mucílago de cacao CCN-51 zona 6.....	26
Tabla 2. Composición química de la levadura.....	27
Tabla 3. Materiales y equipos utilizados en la extracción del mucílago del cacao CCN-51	46
Tabla 4. Materiales, equipos y reactivos para la fermentación	50
Tabla 5. Parámetros de ajuste del reactor Batch	51
Tabla 6. Materiales y equipos para cuantificar la biomasa por el método seco	54
Tabla 7. Materiales, equipos y reactivos para la cuantificación de biomasa por el método de liofilización	56
Tabla 8. Materiales, equipos y reactivos para el método fenol - ácido sulfúrico	60
Tabla 9. Resumen de los modelos matemáticos.....	62
Tabla 10. Datos obtenidos de °Brix y concentración de sustrato en los experimentos.....	65
Tabla 11. Biomasa inicial y final en los experimentos de 8,5; 17; 21 y 24°Brix por el método de liofilización.....	70
Tabla 12. Datos obtenidos de consumo de sustrato y velocidad de reacción mediante experimentación	71
Tabla 13. Datos obtenidos para la gráfica de Lineweaver - Burk.....	72
Tabla 14. Datos obtenidos u_{max} y K_s obtenidos por el modelo de Lineweaver - Burk.....	73
Tabla 15. Datos obtenidos para la gráfica de Eadie Hofstee	74
Tabla 16. Datos obtenidos de u_{max} y K_s por el modelo de Eadie Hofstee.....	75
Tabla 17. Datos obtenidos para la gráfica del modelo de Hanes Woolf.....	75
Tabla 18. Datos obtenidos de u_{max} y K_s por el modelo de Hanes Woolf.....	76
Tabla 19. Resumen de u_{max} , K_s y R^2 obtenido en los diferentes modelos de linealización.....	77
Tabla 20. Resultados de u_{max} y K_s	78



ÍNDICE DE ECUACIONES

Ecuación 1. Velocidad de crecimiento	38
Ecuación 2. Ecuación para el cálculo de la velocidad de reacción en función de la generación de biomasa	40
Ecuación 3. Linealización de Lineweaver - Burk.....	40
Ecuación 4. Linealización Hanes Woolf	41
Ecuación 5. Linealización de Eadie Hofstee	42
Ecuación 6. Ley Lambert - Beer.....	44
Ecuación 7. Corrección de °Brix.....	48
Ecuación 8. Concentración de Biomasa	55
Ecuación 9. Ecuación de Linealidad dada por la curva de calibración.....	60



ÍNDICE DE ILUSTRACIONES

Ilustración 1. Composición del Cacao	23
Ilustración 2. Fases del crecimiento cinético celular	29
Ilustración 3. Tensiones ambientales que presenta la levadura <i>S. Cerevisiae</i> durante la fermentación de etanol.....	30
Ilustración 4. Esquema representativo de la fermentación alcohólica de <i>S. Cerevisiae</i>	32
Ilustración 5. Ruta de la fermentación alcohólica	33
Ilustración 6. Fermentación de <i>S. cerevisiae</i> : (I) glucólisis, (II) oxidación de la glucosa (III) fermentación de la glucosa (IV) oxidación del etanol	33
Ilustración 7. Efecto del pH en el crecimiento microbiano.....	34
Ilustración 8. Cinética de Monod para la velocidad de crecimiento celular en una fermentación por lotes.....	36
Ilustración 9. Velocidad de crecimiento celular y concentración de sustrato para la determinación de las constantes de crecimiento para la ecuación de Monod	39
Ilustración 10. Modelo de Lineweaver - Burk	41
Ilustración 11. Representación del modelo de regresión lineal Hanes Woolf... ..	42
Ilustración 12. Representación del modelo de regresión lineal de Eadie Hofstee	43
Ilustración 13. Obtención y extracción del mucílago de cacao CCN-51	47
Ilustración 14. Procedimiento para la concentración de azúcares	49
Ilustración 15. Procedimiento para preparar la materia prima a usar durante la fermentación	51
Ilustración 16. Procedimiento para el acondicionamiento del reactor	52
Ilustración 17. Procedimiento de inoculación de la levadura.....	53
Ilustración 18. Procedimiento para cuantificación de la biomasa por el método peso seco.....	55
Ilustración 19. Diagrama del punto triple del agua	56
Ilustración 20. Procedimiento para la cuantificación de biomasa por el método de liofilización.....	58
Ilustración 21. Reacción general Método Fenol - Ácido Sulfúrico	59
Ilustración 22. Procedimiento para el método fenol - ácido sulfúrico	61
Ilustración 23. Evolución de °Brix y concentración de sustrato en el experimento de 8,5°Brix	66
Ilustración 24. Evolución de °Brix y concentración de sustrato en el experimento de 17°Brix	67
Ilustración 25. Evolución de °Brix y concentración de sustrato en el experimento de 21°Brix	68
Ilustración 26. Evolución de °Brix y concentración de sustrato en el experimento de 24°Brix	69
Ilustración 27. Gráfica del modelo Lineweaver - Burk.....	73
Ilustración 28. Gráfica del modelo de Eadie Hofstee	74
Ilustración 29. Gráfica del modelo de Hanes Woolf	76
Ilustración 30. Fotografía tomada en la finca en el cantón Naranjal.....	92
Ilustración 31. Fotografía limpieza y lavado de mazorcas de cacao	93



Universidad de Cuenca

Ilustración 32. Cortado, desvenado y recolección de pepas de la mazorca de cacao	93
Ilustración 33. Ablandamiento de las pepas de la mazorca de cacao	93
Ilustración 34. Fluidificación del mucílago de cacao en el laboratorio de alimentos del tecnológico de la Universidad de Cuenca	94
Ilustración 35. Pasteurización del mucílago de cacao.....	94
Ilustración 36. Esterilización de recipientes, envasado y etiquetado del mucílago de cacao	95
Ilustración 37. Ajuste de parámetros del mucílago de cacao para la experimentación.....	96
Ilustración 38. Llenado del mucílago en el reactor Batch.....	96
Ilustración 39. Ajuste de parámetros de funcionamiento en el reactor, en el laboratorio de la Ingeniería de la reacción, Tecnológico de la Universidad de Cuenca.....	97
Ilustración 40. Fotografías del proceso para la cuantificación de biomasa por el método de peso seco en el laboratorio de operaciones unitarias, tecnológico de la Universidad de Cuenca	99
Ilustración 41. Cuantificación de biomasa por el método de liofilización, laboratorio de humidificación y secado, tecnológico de la Universidad de Cuenca.....	101
Ilustración 42. Imágenes tomadas en el laboratorio de operaciones unitarias y lectura en el equipo de UV - Visible	103



Cláusula de Licencia y autorización para publicación en el Repositorio Institucional

Yo, Ana Isabel Alvarado López, en calidad de autora y titular de derechos morales y patrimoniales del trabajo de titulación "Determinación de los parámetros cinéticos como: la velocidad máxima de reacción y la constante de crecimiento en el proceso fermentativo del 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. 114 de la Ley Orgánica de Educación Superior.

Cuenca, 02 de abril del 2019

Ana Isabel Alvarado López
C.I: 0105355127



Cláusula de Licencia y autorización para publicación en el Repositorio Institucional

Yo, Mónica Elizabeth Valdez Arcentales, en calidad de autora y titular de derechos morales y patrimoniales del trabajo de titulación "Determinación de los parámetros cinéticos como: la velocidad máxima de reacción y la constante de crecimiento en el proceso fermentativo del 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. 114 de la Ley Orgánica de Educación Superior.

Cuenca, 02 de abril del 2019

Mónica Elizabeth Valdez Arcentales
C.I: 0302943949



Cláusula de Propiedad Intelectual

Yo, Ana Isabel Alvarado López, autora del trabajo de titulación "Determinación de los parámetros cinéticos como: la velocidad máxima de reacción y la constante de crecimiento en el proceso fermentativo del 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 autora.

Cuenca, 02 de abril del 2019

A handwritten signature in blue ink, appearing to read "Ana Isabel Alvarado López", written over a horizontal line.

Ana Isabel Alvarado López

C.I: 0105355127



Cláusula de Propiedad Intelectual

Yo, Mónica Elizabeth Valdez Arcentales, autora del trabajo de titulación "Determinación de los parámetros cinéticos como: la velocidad máxima de reacción y la constante de crecimiento en el proceso fermentativo del mucílago 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 autora.

Cuenca, 02 de abril del 2019

A handwritten signature in blue ink, appearing to read 'Mónica Elizabeth Valdez Arcentales', written over a horizontal line.

Mónica Elizabeth Valdez Arcentales
C.I: 0302943949



AGRADECIMIENTOS

Gracias a Dios por guiarme y permitirme culminar con esta etapa de mi vida; hoy finaliza pero al mismo tiempo se abren nuevas oportunidades para seguir en el camino del conocimiento y aprendizaje continuo.

Gracias a mis padres José e Isabel, por inculcarme día a día valores y motivarme para salir adelante a pesar de las adversidades convirtiéndose en mi apoyo incondicional, sin ustedes nada hubiera sido posible, gracias por cuidarle como a una hija a mi Ana Paula.

Gracias a mis hermanos Patricio, Nancy, Pablo, Daniel y Marco que siempre estuvieron conmigo en las buenas y no tan buenas sabiendo darme consejos y el apoyo para continuar en el diario caminar universitario.

Gracias a mi esposo Luis Alfredo por ser mi compañero de vida y mi soporte para continuar con mis estudios junto a nuestra hija Ana Paula.

Gracias al Ing. Jorge Delgado, por permitirnos ser parte de su investigación, brindarnos el apoyo necesario y facilitarnos todos sus conocimientos para culminar con esta etapa. Le agradezco infinitamente su comprensión y apoyo para con mi persona, seré eternamente agradecida.

Gracias a mi compañera de tesis Monica por su paciencia, esfuerzo, cariño y por permitirme ser parte de su equipo de trabajo.

Gracias a todos los compañeros que a lo largo de la vida estudiantil permitieron formar una familia en la Universidad de Cuenca que fue como nuestro hogar durante 6 años.

Ana Isabel Alvarado Lopez



Universidad de Cuenca

Quiero expresar mi gratitud a Dios, quien con su bendición llena siempre mi vida y mi profundo agradecimiento a todas los docentes de la Facultad de Ciencias Químicas que me han inculcados las bases para llevar adelante mi vida profesional, gracias por impartir en mi sus conocimientos y formarme a lo largo de este camino, y gracias por la enseñanza de sus valiosos conocimientos hicieron que pueda crecer día a día como profesional, gracias a cada una de ustedes por su paciencia, dedicación, apoyo incondicional y amistad.

Dedico esta tesis a todos aquellos que no creyeron en mí, a aquellos que esperaban mi fracaso en cada paso que daba hacia la culminación de mis estudios, a aquellos que nunca esperaban que lograra terminar la carrera, a todos aquellos que aposaban a que me rendiría a medio camino, a todos los que supusieron que no lo lograría, a todos ellos les dedico esta tesis.

Finalmente quiero expresar mi más grande y sincero agradecimiento al Ing. Jorge Delgado , principal colaborador durante todo este proceso, quien con su dirección, conocimiento, enseñanza y colaboración permitió que se culmine este trabajo de titulación.

Mónica Elizabeth Valdez Arcentales



DEDICATORIAS

Culmino una etapa en mi vida que no hubiera sido posible sin su amor, principios, apoyo, esfuerzo, y dedicación. Este logro les dedico a mis padres José e Isabel por ser mi pilar de vida y la más grande inspiración. Gracias por ser los mejores padres este logro es suyo.

A mi esposo Luis Alfredo, por tu amor, comprensión y paciencia; eres mi soporte y sin tu apoyo permanente nada hubiera sido posible; porque compartes conmigo los logros y fracasos, este resultado y los que vengan te lo dedico a ti amor de mi vida.

A mi hija Ana Paula por estar conmigo durante toda mi tesis, compartiendo el sacrificio y esfuerzo de alcanzar el objetivo, eres mi más grande motivación y juntas lo conseguimos mi princesa.

Ana Isabel Alvarado Lopez



Universidad de Cuenca

El presente trabajo investigativo lo dedico principalmente a Dios, por ser el inspirador y darme fuerza para continuar en este proceso de obtener uno de los anhelos más deseados. A mis padres Rosa y Galo por su amor, trabajo y sacrificio en todos estos años, gracias a ustedes he logrado llegar hasta aquí y convertirme en lo que soy. Ha sido el orgullo y el privilegio de ser su hija, son los mejores padres.

A mi hermana Sonia de manera más especial por ser el apoyo incondicional, moral y brindarme el amor más puro de hermana que me ha impulsado a continuar este camino tan largo para mi formación personal y profesional.

De manera especial también a mis amigos Boris, Lizeth y Cintia incondicionales que han sido un pilar fundamental a largo de mi vida y carrera universitaria, aprendiendo de los momentos malos y buenos que la vida nos ha presentado.

Mónica Elizabeth Valdez Arcentales



CAPITULO 1: INTRODUCCIÓN

El uso energético mundial se incrementa notablemente y el requisito previsto para 2030 será de 50% mayor que en la actualidad, la disminución de los combustibles fósiles asociado a los problemas medio ambientales conlleva a la búsqueda de nuevas alternativas energéticas que permitan sustituir los combustibles derivados del petróleo. (Vandna, Ravindra, Pankaj, & Rakesh, 2015). Los biocombustibles son líquidos, sólidos o gaseosos, por ejemplo los bioalcoholes, biodiesel, biogás; sin embargo los más utilizados son los líquidos y de manera especial en Ecuador el bioetanol o biodiesel, estos resultan una alternativa prometedora como fuente energética competitiva, es por ello que los investigadores han puesto notable énfasis en identificar materias primas y procesos que permitan el aprovechamiento máximo. (Kang & Lee, 2015) El bioetanol actualmente representa una de las ofertas energéticas alternativas en frente al uso de combustible fósiles, el etanol y biodiesel son industrialmente producidos a partir de la fermentación de biomasa y por la trans-esterificación química de aceites; los procesos fermentativos derivan de compuestos con alto contenido en azúcares aplicando como catalizador de la reacción microorganismos como la levadura *S. Cerevisiae* (Kang & Lee, 2015)

El Ecuador tiene un gran potencial agrícola por su ubicación geográfica, clima y otros factores que favorecen al cultivo de varios productos que generan desechos, es así que el atlas bioenergético del Ecuador ha analizado los cultivos agrícolas más relevantes como son: arroz, banano, cacao, café, caña de azúcar, maíz, palma africana, palmitos, plátanos, entre ellos el cacao es uno de los productos con mayor proyección, que es utilizado como materia prima para la obtención de productos elaborados. (Atlas bioenergético del Ecuador., 2014) “Ecuador está situado en el cuarto lugar como productor de cacao en grano a nivel mundial y el primero a nivel del continente americano”. (CFN, 2018) El cultivo de cacao representa aproximadamente el 8% del PIB agropecuario del Ecuador, convirtiéndose en un factor de gran incidencia en la economía del país. En la actualidad Ecuador produce dos tipos de cacao: fino de aroma y CCN - 51, los cuales del total de la exportación son el 75% y 25% respectivamente (CFN, 2018).



Universidad de Cuenca

La producción de cacao está orientada a la elaboración de derivados que utilizan como materia prima únicamente la pepa, el contenido mucilaginoso del cacao es desechado por los agricultores. De acuerdo a la investigación realizada en el cantón Naranjal de la provincia del Guayas por (Arteaga Estrella, 2013) obtuvo como resultados que el desaprovechamiento del mucílago está dado por factores como la falta de conocimientos, desinterés de los agricultores y por falta de innovación.

El mucílago de cacao es considerado como un residuo no aprovechado y valorado por la industria cacaotera, en el año 2016, se analizó el contenido mucilaginoso del cacao CCN - 51, obteniendo como resultados que este residuo presenta un elevado contenido de azúcares, característica fundamental para un proceso fermentativo. (Quizhpi Nieves, 2016)

El bioetanol se obtiene por fermentación de azúcares procedentes, principalmente de maíz, caña de azúcar y de otras materias primas ricas en azúcares, siendo el biocombustible que se produce en mayor cantidad en el mundo, el producto del proceso de fermentación contiene una gran cantidad de agua que se debe eliminar para poder utilizarla como combustible, las sustancias azucaradas liberan fácilmente los azúcares fermentables. (Arteaga Estrella, 2013)

Desde el año 2016 se han desarrollado investigaciones para la optimización de la producción de bioetanol mediante la fermentación del mucílago de cacao CCN – 51 con levadura *Saccharomyces Cerevisiae*. La optimización de la producción de bioetanol en el proceso fermentativo del mucílago de cacao CCN – 51, está en función de condiciones de operación que han sido investigadas por Guncay & Silva alcanzando resultados de temperatura, pH y concentración de levadura con datos de 35°C, 4 y 3 g/L respectivamente. Los parámetros anteriormente mencionados son indispensables para la aplicación experimental en el estudio de las variables involucradas el comportamiento cinético de la producción de bioetanol en los procesos fermentativos que se fundamentan en la ecuación de Monod.

El control de procesos fermentativos requiere de varios parámetros cinéticos que actualmente son identificados mediante simulación y de forma teórica, sin



Universidad de Cuenca

embargo, las variables que modelan el comportamiento cinético de la reacción en el proceso fermentativo del mucílago de cacao CCN – 51, investigaciones previas, han determinado por simulación; por el contrario la metodología utilizada para la obtención de estos parámetros cinéticos, realizados en este estudio presenta un componente experimental.

La experimentación se fundamenta en métodos gráficos, por lo que se requiere de gran precisión y exactitud en el control de las variables durante el proceso. La determinación de la velocidad máxima de reacción y la constante de crecimiento por vía experimental servirán para comprobar el porcentaje de similitud con los resultados obtenidos en la investigación de Guncay & Silva mediante el software Matlab (versión 8.3)

1.1 Objetivo General y Específicos

1.1.1 Objetivo General

Determinar los parámetros cinéticos como: La velocidad máxima de reacción y la constante de crecimiento en el proceso fermentativo del mucílago de cacao CCN-51 caso Ecuador, zona 6.

1.1.2 Objetivos Específicos

- Ajustar los parámetros del reactor Batch Biotron GX Single Vessel a diferentes concentraciones de sustrato.
- Cuantificar la cantidad de sustrato consumido por el método fenol – ácido sulfúrico y biomasa generada por el método gravimétrico peso seco y liofilización en el proceso fermentativo del mucílago de cacao CCN-51.
- Determinar la velocidad máxima de reacción y la constante de crecimiento, con diferentes métodos experimentales: Lineweaver – Burk, Hanes Woolf y Eadie Hofstee.
- Contrastar los valores obtenidos mediante vía experimental con respecto a los simulados en MATLAB (Versión 8.3)



CAPÍTULO 2: CONTENIDO TEÓRICO

2.1 Generalidades del cacao

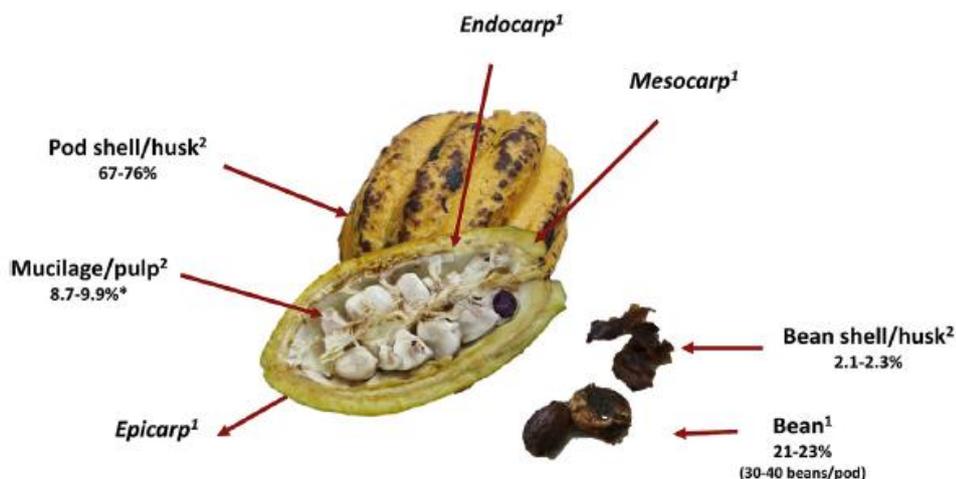
“*Theobroma* proviene de los vocablos del griego, *theo* – Dios y *broma* – alimento; es decir alimento de los Dioses; el epíteto cacao es un término que proviene de la lengua náhuatl”. (Arteaga Estrella, 2013) “Esta lengua denomina a la semilla del cacao como cacáhuatl, posteriormente a la caída de la desinencia –tl, cacahua se volvió cacao por analogía con la formación de los nombre de los frutales”. (Zanetti, 2012)

“El nombre científico del cacao es *Theobroma cacao L*, pertenece a la familia Malvaceae, subfamilia Sterculioidae y comprende 22 especies; todas las especies crecen bajo las condiciones de bosques tropicales lluviosos”. (Dostert, Roque, Cano, La Torre, & Weigend, 2011)

“El área de repartición natural se extiende desde la cuenca del amazonas por el sur hasta la región de México, siendo su centro de diversidad en la región amazónica siendo en la actualidad Brasil, Perú, Ecuador, Venezuela y Colombia”. (Dostert et al., 2011)

Theobroma cacao L es un árbol que tiene una altura entre 12 – 20 m y normalmente en cultivo se mantienen en tamaños de 4 – 8 m, el fruto es una mazorca polimorfa, de color púrpura o amarillo en la madurez con un tamaño de 20 -35 cm de largo. (Dostert et al., 2011) La fruta del cacao contiene de 30 a 50 semillas. El número, tamaño o forma de la semilla es una característica fluctuante, son cuerpos aplanados elipsoidales de 2-4 cm de largo rodeada por una envoltura blancuzca y azucarada. (Arteaga Estrella, 2013)

Ilustración 1. Composición del Cacao



Fuente: (Campos-Vega, Nieto-Figueroa, & Oomah, 2018)

El medio natural del cacao es el interior de bosques lluviosos subtropicales sudamericanos, la temperatura y precipitación son los factores predominantes para el crecimiento de las plantas de cacao, están son sensibles a la cantidad de agua en el suelo y son aptas a la sequedad; las temperaturas mínimas medidas son de 18 – 21 °C, las máximas de 30 – 32°C. En condiciones climáticas como por ejemplo, las de África occidental, el cacao puede resistir períodos secos de hasta 3 meses, las condiciones climáticas particulares en Ecuador permiten cultivar cacao en lugares secos de hasta 6 meses. (Dostert et al., 2011)

2.1.1 Historia del cacao

Tradicionalmente se considera que el punto de origen de la domesticación del cacao se encontraba en Mesoamérica ente México, Guatemala y Honduras, donde su uso está atestiguado alrededor de 2000 AC, por otra parte estudios demuestran que siquiera una variedad de Theobroma cacao tiene su punto de origen en la alta Amazonía y que ha sido utilizada en la región por más de 5000 años. El primer europeo en descubrir granos de cacao fue Cristóbal Colón, al llegar a lo que hoy es Nicaragua. Antes del descubrimiento de América, las culturas Toltecas, Mayas y Aztecas ya lo cultivaban; usaban al cacao como moneda para preparar bebida, el XOCOLAT. En las primeras décadas del siglo XIX, más del 50% de la producción de cacao estaba localizada en Venezuela. En 1820, portugueses introdujeron el cacao en Ghana y otros países africanos,



Universidad de Cuenca

en esa época la tercera parte de la producción mundial era consumida por los españoles. A concluir el siglo XIX los suizos producen el primer chocolate en leche. (Anecacao, 2015)

2.1.2 Cacao en el Ecuador

La cultura del cacao en Ecuador es milenaria, se considera que a la llegada de los españoles ya se observaban grandes árboles de cacao que manifestaban el conocimiento y la utilización de esta especie. (Anecacao, 2015)

En 1830, se declara la fundación de Ecuador y muchas familias adineradas se dedican a cultivar el cacao en sus tierras. En la década de 1890, Ecuador es el mayor exportador mundial de cacao, los primeros bancos del país se crean gracias a la solidez económica que ofrece el cacao. Durante 1920, se produce la aparición y expansión de enfermedades provocando la reducción del 30% de producción, por otra parte la falta de medios de transporte y de mercado, el cacao y la economía ecuatoriana entra en un período de depresión e inestabilidad. (Anecacao, 2015)

Actualmente existen dos tipos de cacao en el Ecuador: El Nacional o trinitario que es explotado por pequeños productores y tiene bajos rendimientos debido a la falta de tecnología. El cacao Colección Castro Naranjal-51 (CCN-51), es una variedad cultivada en grandes extensiones y presenta mayor rendimiento si es comparado con el cacao Nacional, además, esta variedad tiene gran productividad alcanzando hasta 50 quintales mientras que el cacao Nacional alcanza apenas 6 quintales por hectárea. (Alvarado Uriña, Morales Intriago, Carrillo Zenteno, Suarez Zambrano, & Briones Caicedo, 2016)

2.1.2.1 Cacao CCN-51

“Es un cacao clonado de origen ecuatoriano que el 22 de junio del 2005 fue declarado, mediante acuerdo ministerial un bien de alta productividad”. (Anecacao, 2015) A partir de esta declaratoria el Ministerio de Agricultura inicia el apoyo para avivar producción, comercialización y exportación de este tipo de cacao, el clon CCN-51 es considerado cacao ordinario, corriente o común. (Anecacao, 2015)

Homero Castro, logra en 1960 en su finca localizada en Naranja cuyo fue “Theobroma”, logró seleccionar varios híbridos con características deseadas y



Universidad de Cuenca

específicas, luego de esto logró clonificar algunos de ellos a los que nombró con las siglas CCN-51 que significa “Colección Castro Naranjal” (Anecacao, 2015)

Las principales características de este cacao son: presenta una alta productividad, el clon es autocompatible por lo que no requiere de una polinización cruzada; se caracteriza por iniciar la producción a los 24 meses, es decir, un tiempo menor con relación a los otros tipos de cacao; es una planta con buen crecimiento, de baja altura disminuyendo las labores agronómicas como poda y cosecha; contiene un índice de mazorca (IM) 8 mazorcas/libra; presenta un índice de semilla de 1,45 g/semilla seca y fermentada; el índice de semilla por mazorca es de 45; el porcentaje de manteca es del 54% factor de gran importancia industrial; CCN-51 es de fácil adaptabilidad a casi todas las zonas tropicales del Ecuador. (Fajardo Garces, 2013)

2.2 Mucílago de cacao

“El mucílago de cacao es una sustancia viscosa, hialina, la pulpa mucilaginoso está compuesta por células esponjosas paranquimatosas, que contienen células ricas en azúcares (10-13%), pentosas (2-3%), ácido cítrico (1-2%) y sales (8-10%)” (Arteaga Estrella, 2013) Debido a la composición del mucílago esta favorece a procesos fermentativos y por otra parte se puede obtener diferentes productos como: jalea de cacao, alcohol, y vinagre, nata y pulpa procesada. (Arteaga Estrella, 2013)

El mucílago hidrolizado es conocido en la industria como exudado. Durante la fermentación provee el sustrato para varios microorganismos que en el caso de las semillas son esenciales para el desarrollo del sabor del chocolate y la pulpa fresca es esencial para procesos fermentativos. (Arteaga Estrella, 2013)

En la producción de cacao en el Ecuador, el mucílago es considerado como un residuo de gran cantidad, debido a varios factores como: carencia de conocimientos, desinterés de los agricultores y por falta de innovación, no es utilizado ni aprovechado con un enfoque industrial con rédito económico; el mismo posee un gran poder fermentativo, factor clave para el desarrollo de nuevos productos.



Universidad de Cuenca

2.2.1 Características físico químicas del mucílago de cacao CCN – 51 zona 6

En la presente tabla se describe las características físico químicas del mucílago de cacao CCN-51 zona 6, que es la materia prima utilizada en esta investigación.

Tabla 1. Características físico - químicas del mucílago de cacao CCN-51 zona 6

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

Fuente: (Quizhpi Nieves, 2016)

2.3 Levadura

Las levaduras son hongos unicelulares, de forma esférica, ovalada o cilíndrica cuya reproducción se da por gemación o fisión. Su presencia y crecimiento depende de la disponibilidad de carbono orgánico, pH, temperatura y la presencia de agua que exista en el medio; el hábitat de las levaduras es en materias orgánicas de origen vegetal que son ricas en carbohidratos. Las levaduras son utilizadas por el ser humano desde muchos siglos particularmente en la fabricación de bebidas alcohólicas y pan. (Barrera & Reyes Muro, 2015)

Las levaduras son abundantes y de gran importancia debido a que tienen la capacidad de transformar los hidratos de carbono en alcohol y CO₂, estos organismos se encuentran abundantemente donde existe la presencia de azúcares. (Dútan Mora, 2014)

En procesos fermentativos a gran escala se utilizan levaduras de tipo industrial, cuyo objetivo es aumentar la capacidad de producción y la resistencia a factores no óptimos como altas temperaturas, variaciones de pH, entre otros. Existe diferencia entre las levaduras comerciales e industriales, el cual consiste



Universidad de Cuenca

en que las comerciales no soportan condiciones extremas de trabajo. (Dútan Mora, 2014)

2.3.1 Composición de la levadura

Tabla 2. Composición química de la levadura

Componentes	Porcentaje
Carbohidratos	18 – 44%
Proteínas	36 – 60%
Ácido nucleico	4 – 8%
Lípidos	4 – 7%
Inorgánicos totales	6 – 10%
Fósforo	1 – 3%
Potasio	1 – 3%
Sulfato	0 – 4%

Fuente: (Dútan Mora, 2014)

2.3.2 Requerimiento nutricional

La levadura *S. Cerevisiae* requiere nutrientes y condiciones ambientales específicas para su crecimiento y reproducción; el medio de cultivo debe contribuir con elementos nutritivos para su desarrollo y requiere de sustancias como carbono, nitrógeno, fósforo, potasio, magnesio y zinc. (López Legarda, Taramuel Gallardo, Segura Sánchez, & Restrepo Bentacur, 2017)

- **Carbono:** sirve como fuente de energía y como material para multiplicación de las células, está disponible en compuestos orgánicos, ácidos orgánicos y carbohidratos como glucosa y sacarosa (Cardozo Guzmán & Moreno Cardozo, 2012)
- **Nitrógeno:** tiene una influencia directa sobre la biomasa incrementando el crecimiento durante la fase exponencial lo que produce una sobreproducción de células de levadura y una conversión rápida de la célula como el mínimo de etapas de crecimiento, como fuentes para los microorganismos encontramos amidas, urea y sales amónicas. (Nolivos Campoverde, 2017)
- **Fósforo:** es importante en la síntesis de hexosas, fosfato y triosas para la formación de etanol. Favorece a la acumulación de energía y encontramos en sales de fosfato y extracto de levadura. (López-Pérez et al., 2018)



Universidad de Cuenca

- **Potasio:** actúa en procesos de transporte celular y regula el potencial osmótico e interviene en el metabolismo enzimático, está disponible en extracto de levadura y en sales de fosfato. (Oliveira Nunes et al., 2017)
- **Magnesio:** permite el buen funcionamiento del metabolismo de la levadura como la estructura celular, la falta de este nos lleva a la producción de ácido acético, se encuentra en sales de magnesio. (Nolivos Campoverde, 2017)
- **Zinc:** es un factor clave en la glucólisis ya que estimula la acción del magnesio. (Scheiblauer, Scheiner, Joksch, & Kavsek, 2018)

2.3.3 Levadura “*Saccharomyces Cerevisiae*”

“*S. cerevisiae* significa azúcar de hongos, pertenece al género de las levaduras de la familia *Sacchaomycetaceae*, las células son esferoidales, elipsoidales o cilíndricas”. (López Legarda et al., 2017)

Se identifica por no necesitar severos requerimientos nutricionales y condiciones ambientales para su crecimiento. (Cardozo Guzmán & Moreno Cardozo, 2012)

La apariencia de las colonias es variada, puede ir desde color crema a ligeramente café, de lisa a rugosas y en ocasiones brillantes u opacas. (Cardozo Guzmán & Moreno Cardozo, 2012) La temperatura óptima de crecimiento es de 25 a 30°. (López Legarda et al., 2017) El crecimiento de esta levadura se da de manera óptima en pH ácidos y tiene la capacidad de fermentar azúcares como: glucosa, fructosa, sacarosa, maltosa y maltotriosa. (Cardozo Guzmán & Moreno Cardozo, 2012)

Saccharomyces cerevisiae es la especie de levaduras utilizado por excelencia para la producción de etanol a nivel industrial, debido a que es un microorganismos de fácil manipulación, no es exigente en cuanto a su cultivo, no presenta alto costo y tolera altas concentraciones de etanol, en el proceso fermentativo produce bajos niveles de subproductos, utiliza altas concentraciones de azúcares. (López Legarda et al., 2017)

2.3.4 Cinética de crecimiento de la levadura

La fase del crecimiento se considera como el aumento ordenado de todos los constituyentes químicos de un organismo, en organismos unicelulares conduce a un aumento en el número de individuos de la población. (Dútan Mora, 2014)

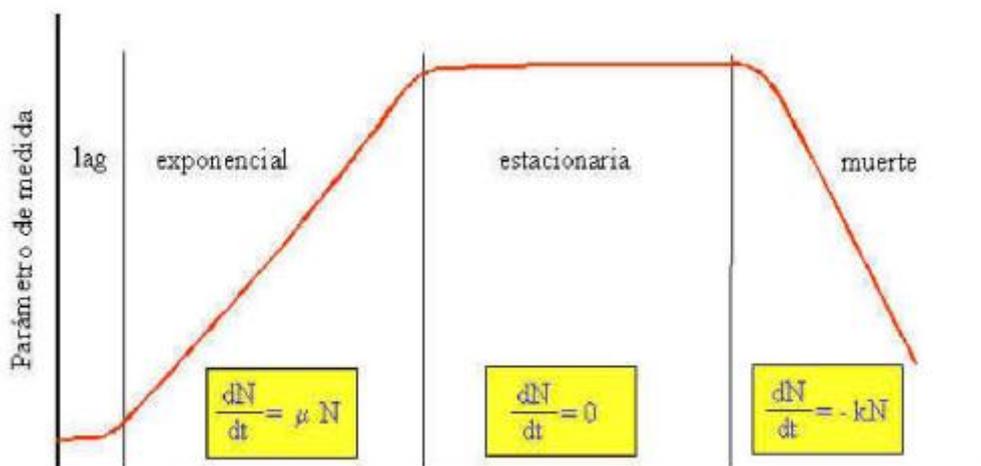


Universidad de Cuenca

La levadura exhibe cinco fases de crecimiento; estas fases son:

- **Fase de adaptación (Lag):** constituye el período de adaptación de microorganismos al nuevo medio, esta fase inicia después del proceso de inoculación, durante esta etapa la velocidad de crecimiento es cero. (Dútan Mora, 2014)
- **Fase exponencial (Log):** en esta etapa se da la síntesis de todos los nutrientes celulares aumentando a una velocidad constante, de esto modo duplica la población de células continuamente a intervalos regulares. (Dútan Mora, 2014)
- **Fase estacionaria:** se caracteriza por no carecer de crecimiento, es decir permanece constante. El crecimiento puede ocurrir, sin embargo, existe un equilibrio por la rapidez de muerte celular. Se da la formación de productos tóxicos que provocan el cambio físico del medio. (Dútan Mora, 2014)
- **Fase de muerte celular:** Esta fase es de reducción debido a que la velocidad de crecimiento es menor a la de desaparición disminuyendo la cantidad de células. (Dútan Mora, 2014)

Ilustración 2. Fases del crecimiento cinético celular



Fuente: (Dútan Mora, 2014)

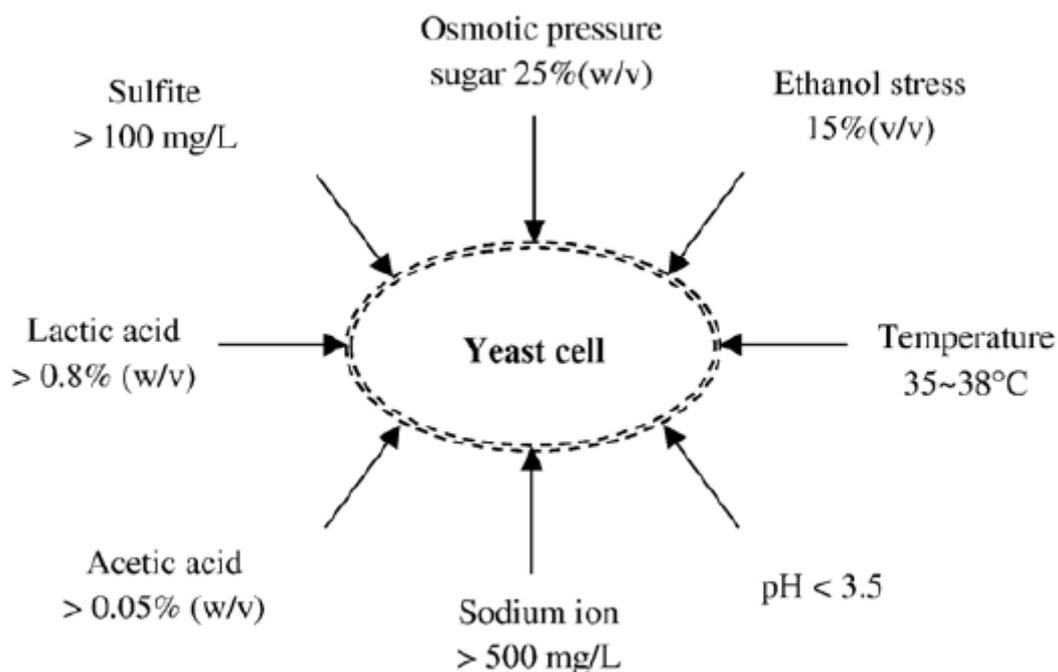
2.3.5 Influencias del entorno

Durante la fermentación para la producción de etanol las células de levadura sufren tensiones, algunas son ambientales como deficiencia de nutrientes, altas temperaturas y contaminación.



Universidad de Cuenca

Ilustración 3. Tensiones ambientales que presenta la levadura *S. Cerevisiae* durante la fermentación de etanol



Fuente: (Bai, Anderson, & Moo-Young, 2007)

- **Efecto de la concentración del sustrato:** el crecimiento óptimo de la levadura se da en un medio que contenga la concentración entre el 10 – 18% de azúcares, en ciertas ocasiones se emplean concentraciones muy altas como de 22% causando la inhibición del crecimiento debido al alto esfuerzo osmótico provocando deshidratación, problemas disfuncionales y la rapidez de crecimiento disminuye. (Nolivos Campoverde, 2017)
- **Efecto del pH en el crecimiento microbiano:** los microorganismos como la *S. cerevisiae* crece adecuadamente en pH ácidos, y su pH óptimo de crecimiento está en el rango de 3,5 a 5,5. (Ge & Bai, 2006)
- **Efecto de la temperatura en el crecimiento microbiano:** la levadura *S. cerevisiae* es un microorganismo mesófilo, sus condiciones óptimas de crecimiento se encuentran en el rango de temperatura de 20 – 37°C, el incremento excesivo de temperatura aumenta la muerte celular provocado por la desnaturalización de proteína, a bajas temperaturas los mecanismos de las célula afectan el transporte del sustrato hacia afuera y dentro de la



Universidad de Cuenca

célula. La temperatura óptima es de 30°C y con lleva a la máxima velocidad de reacción. (Nolivos Campoverde, 2017)

- **Inhibición por producto:** cuando existe una exceso (20%v/v) en la concentración de etanol, el metabolismo celular se detiene obstruyendo en el crecimiento de células impidiendo la velocidad de reacción del microorganismo por el producto. (Nolivos Campoverde, 2017)

2.4 Fermentación

“La fermentación es un proceso catabólico de oxidación completa, no requiere oxígeno dando como producto final un compuesto orgánico”. (Barrera & Reyes Muro, 2015)

La fermentación típica es llevada por levaduras, en la industria la fermentación puede ser oxidativa es decir en presencia de oxígeno pero es una oxidación aeróbica incompleta como la producción de ácido acético a partir de etanol. (Barrera & Reyes Muro, 2015)

2.4.1 Tipos de fermentación

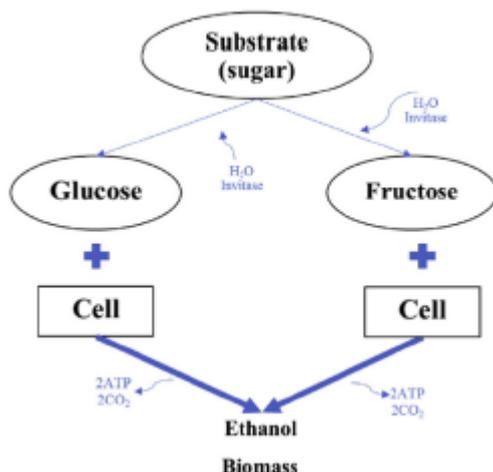
- **Fermentación continua:** se desarrolla en un sistema abierto, el sustrato se añade continuamente al bioreactor, una suma equivalente de cultivo con los microorganismos y se saca simultáneamente del sistema. (Dútan Mora, 2014)
- **Fermentación discontinua:** también se los conoce como procesos Batch o lote son importantes dentro de la biotecnología y tienen gran utilidad en la industria. El sustrato se inocula con microorganismos y permite que se lleve a cabo la fermentación en condiciones óptimas, durante la fermentación únicamente se adiciona ácidos o bases para regular el pH, la concentración de sustrato, la concentración de biomasa, la composición del medio y la concentración de metabolitos cambia continuamente como resultado del metabolismo celular. (Dútan Mora, 2014)
- **Fermentación alcohólica:** esta fermentación también se la conoce como fermentación del etanol, es un proceso biológico de fermentación en un ambiente anaerobio originado por la interacción de microorganismos que procesan los hidratos de carbono (glucosa, fructosa, sacarosa y almidón), para obtener como producto final un alcohol en forma de etanol



Universidad de Cuenca

(CH₃CH₂OH), dióxido de carbono (CO₂) en forma de gas y moléculas de ATP (Adenosintrifosfato) que consumen los microorganismos en su metabolismo celular energético. (Dútan Mora, 2014)

Ilustración 4. Esquema representativo de la fermentación alcohólica de *S. Cerevisiae*



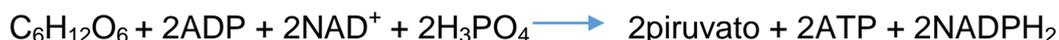
Fuente: (Lerkkasemsan & Lee, 2018)

2.4.2 Glucólisis para producción de etanol en medio anaerobio

En la fermentación alcohólica las levaduras descarboxilan el piruvato obtenido de la ruta Embden-Maeyerhof-Parnas más conocida como glucólisis, dando acetaldehído, y este reduciéndose a etanol por la acción del NADH₂ (Nicotinamida adenina dinucleótido), siendo la reacción global: (Dútan Mora, 2014)



El balance energético de la fermentación se da de la siguiente manera:



Fuente: (Nolivos Campoverde, 2017)

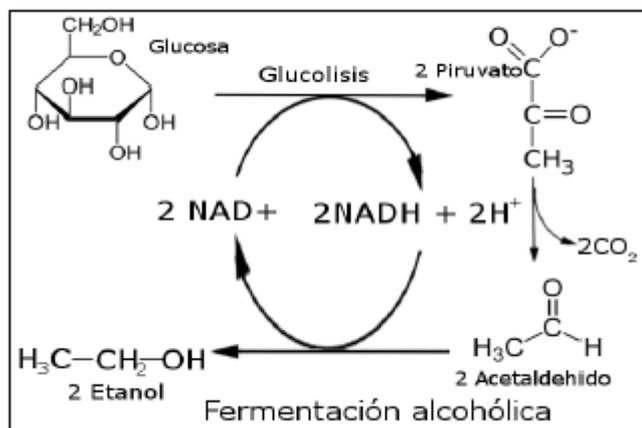


Universidad de Cuenca

La forma simplificada de representar esta reacción en el que los productos (P) se incluyen a CO₂, agua, biomasa y etanol. (Nolivos Campoverde, 2017)

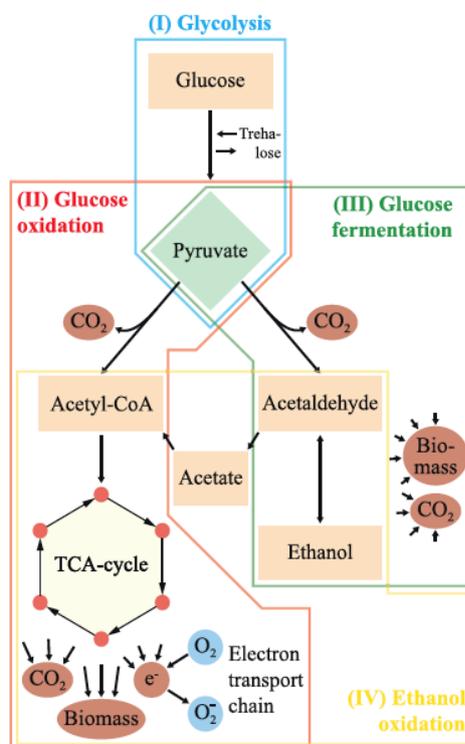


Ilustración 5. Ruta de la fermentación alcohólica



Fuente: (Nolivos Campoverde, 2017)

Ilustración 6. Fermentación de *S. cerevisiae*: (I) glucólisis, (II) oxidación de la glucosa (III) fermentación de la glucosa (IV) oxidación del etanol



Fuente: (Scheiblaue et al., 2018)



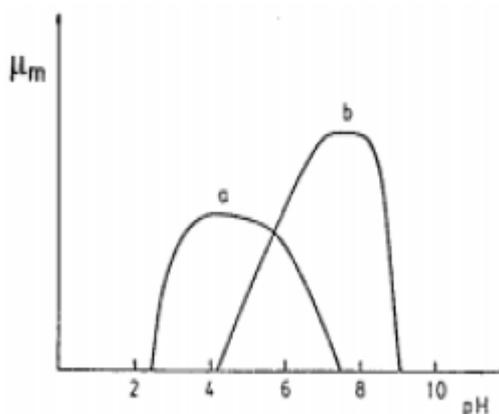
Universidad de Cuenca

2.4.3 Factores que influyen en el proceso fermentativo

En el proceso fermentativo, se busca conseguir un equilibrio entre el crecimiento de la levadura y el metabolismo celular. Los parámetros que influyen en el proceso, como la disponibilidad de nutrientes, inoculación, concentración de oxígeno disuelto, la temperatura, etc afectan al crecimiento de la levadura. (Oliveira Nunes et al., 2017)

- **Concentración de sustrato:** la velocidad específica de crecimiento celular durante la etapa de crecimiento y desaceleración en un cultivo discontinuo está estrechamente relacionado con la concentración de nutrientes existentes en el medio. Generalmente un único sustrato predomina sobre la velocidad de crecimiento a este componente se le denomina sustrato limitante de la velocidad de crecimiento. Habitualmente el sustrato limitante es una fuente de carbono o de nitrógeno, en algunos casos es el oxígeno y otro oxidante como los nitratos. (Dútan Mora, 2014)
- **Efecto del pH:** en la ilustración 7 se representa de forma general la variación de la velocidad específica de crecimiento con el pH para hongos y bacterias. De la misma se puede observar claramente que de manera general los microorganismos como el *S. cerevisiae* tiene un pH óptimo cercano a cinco mientras que para las bacterias se da alrededor de 7; por otra parte debido a la forma achatada de las curvas, variaciones de 0,5 unidades de pH alrededor del óptimo no tiene mayor influencia.

Ilustración 7. Efecto del pH en el crecimiento microbiano



Fuente: (Dútan Mora, 2014)



Universidad de Cuenca

- **Efecto de la temperatura:** cada reacción química individual de todas las que conforman el metabolismo, es afectada por la temperatura, por lo que un incremento resultaría en un incremento de la velocidad de crecimiento específica, por otra parte aumentos posteriores de temperatura inactivan las enzimas que catalizan las reacciones, provocando la disminución de la velocidad de crecimiento específico. Es importante mantener la temperatura de cultivo en su valor óptimo para un crecimiento adecuado. (Dútan Mora, 2014)

2.4.4 Cinética de fermentación

En los procesos de fermentación alcohólica las variables de mayor interés son la velocidad de producción de metabolitos (alcohol, glicerol y ácidos orgánicos), de consumos de sustratos (como azúcares, nitrógeno, oxígeno) y de crecimiento del microorganismo dentro del bioreactor, rendimiento y productividad. En procesos discontinuos se ve claramente que durante el proceso de fermentación alcohólica, la concentración de sustrato disminuye a lo largo del tiempo como consecuencia del crecimiento de los microorganismos. Luego de la fase de adaptación del microorganismo el sustrato se consume a mayor velocidad, depende de las condiciones del medio (pH, temperatura y disponibilidad de nutrientes, etc). Durante la fase de crecimiento exponencial incrementa la concentración celular, esta fase transcurre hasta que casi todo el sustrato se ha consumido cuando esto ocurre el crecimiento se detiene rápidamente. (Paz Blanco, 2016)

2.4.5 Cinética de consumo de sustrato

La velocidad de consumo de sustrato depende directamente de la concentración de nutrientes disponibles en el medio y de las condiciones utilizadas para el crecimiento celular como pH, temperatura, etc. (Nolivos Campoverde, 2017)

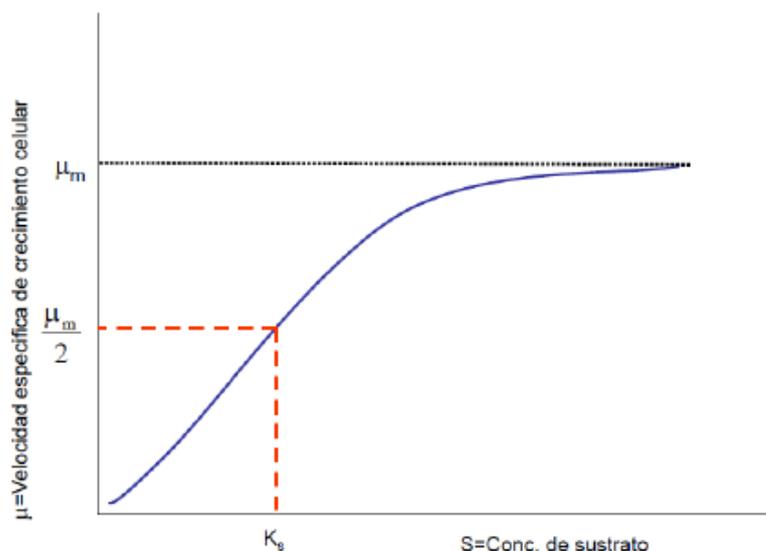
Al inicio de la fase de adaptación la células teniendo como alimento a los nutrientes del sustrato realizan procesos de mantenimiento, reparación celular, síntesis de proteínas y producción de energía para sobrevivir a las condiciones del medio, posteriormente, el sustrato se consume a mayor velocidad y la fase lag, se presenta hasta que se ha consumido el sustrato casi en su totalidad. En



Universidad de Cuenca

la siguiente ilustración se puede observar el consumo de sustrato en una fermentación alcohólica por lotes

Ilustración 8. Cinética de Monod para la velocidad de crecimiento celular en una fermentación por lotes



Fuente: (Blanco Paz, 2016)

2.5 Generación de Biomasa

La biomasa es la cantidad de materia viva producida en la superficie terrestre o por organismos de un tipo específico. Generalmente este término hace referencia con mayor frecuencia a discusiones relativas a la energía de biomasa, asociado al combustible energético que se obtiene indirecta o directamente a partir de recursos biológicos. (Gracia Carvajal & Mateo Coello, 2016)

La generación de biomasa se produce durante el proceso fermentativo, el cual implica una serie de reacciones bioquímicas que se lleva a cabo en un fermentador o bioreactor, mediante el cual algunos sustratos que componen el medio de cultivo son convertidos por acción microbiana en metabolitos o en biomasa, el microorganismo va aumentando su concentración durante el lapso del proceso al mismo tiempo que el medio de cultivo se va modificando generando biomasa y formando productos. (Patricia Durango Londoño, Villegas Escobar, & Carvajal, 2007)



Universidad de Cuenca

2.6 Modelos cinéticos de la fermentación

Los modelos cinéticos son expresiones matemáticas que relacionan el comportamiento de una o más variables de respuesta a lo largo del tiempo a partir de datos experimentales; los datos vienen dados por la estequiometría particular del proceso estudiado y por tanto si existe variación en las condiciones de operación el modelo cinético no es válido. Como ejemplo tenemos la correlación de la velocidad de consumo de nitrógeno asimilable por la levadura a lo largo del tiempo de fermentación. El establecimiento de modelos cinéticos para llevar a cabo la fermentación exige un estricto control sobre las condiciones de operación. (Paz Blanco, 2016)

2.6.1 Cinética de Monod

Monod fue el primero en investigar el efecto de la concentración de sustrato sobre la velocidad de crecimiento y determinó que la velocidad específica de crecimiento de las células durante la fase de crecimiento y desaceleración depende de la concentración de nutrientes que existan en el medio. Durante el crecimiento equilibrado la velocidad específica está relacionada con la concentración de sustrato limitante del crecimiento mediante la ecuación de Monod, una expresión homóloga a la de Michaelis-Menten. (Nolivos Campoverde, 2017)

En el proceso de fermentación alcohólica el crecimiento celular describe que a concentraciones bajas de sustrato, la velocidad específica de crecimiento es proporcional a la concentración de sustrato (S), pero a medida que aumenta, la velocidad de crecimiento se acerca a un límite máximo, describiéndose mediante el modelo de Monod. (Paz Blanco, 2016)

El modelo de Monod describe una curva de crecimiento, en la cual presenta una primera etapa de adaptación al medio que depende del número de células y del sistema metabólico. Posteriormente se presenta un crecimiento exponencial que ocurre a la máxima velocidad, la duración de esta etapa depende de la concentración inicial del sustrato limitante; así como, la facilidad del microorganismo para adaptarse a la disminución de sustrato; en el punto en el que se presenta limitación de sustrato, la velocidad específica de crecimiento se comporta en función de la siguiente expresión: (Acosta Romero, 2012)



$$\mu = \frac{u_{max} * S}{K_s + S}$$

Donde:

S: concentración de sustrato limitante del crecimiento y se expresa en g/L

u_{max} : velocidad específica máxima de crecimiento y se expresa en h^{-1}

μ : velocidad de aumento de la concentración celular por unidad de tiempo y se expresa en h^{-1}

K_s : constante de crecimiento de Monod y se expresa en g/L

2.7 Parámetros cinéticos

Los parámetros cinéticos de crecimiento microbiano son las herramientas básicas para escalar los procesos biotecnológicos que se dan en el laboratorio, puesto que permite predecir pronosticar el desarrollo de la fermentación y permite evaluar el rendimiento y la productividad en los procesos. Un efecto positivo sobre los valores de los parámetros cinéticos de crecimiento permite disminuir los tiempos y aumentar los rendimientos y las productividades de procesos industriales. (Zapata, Hoyos, & Quinchía, 2005)

2.7.1 Velocidad máxima de reacción (u_{max})

La velocidad de una reacción química se relaciona con el cambio de la concentración de las especies (reactivos y productos) por unidad de tiempo, se requiere de la determinación de la concentración de las especies que son determinados por métodos químicos o físicos. (Lodeiro, 2015)

La concentración de sustrato cambia durante el transcurso de la reacción afectando a la velocidad de reacción; en la figura N° 9, se observa que a bajas concentraciones de sustrato, la velocidad de crecimiento incrementa casi linealmente con el incremento de la concentración de sustrato, por otra parte, a concentraciones mayores de sustrato, los incrementos de la velocidad de



Universidad de Cuenca

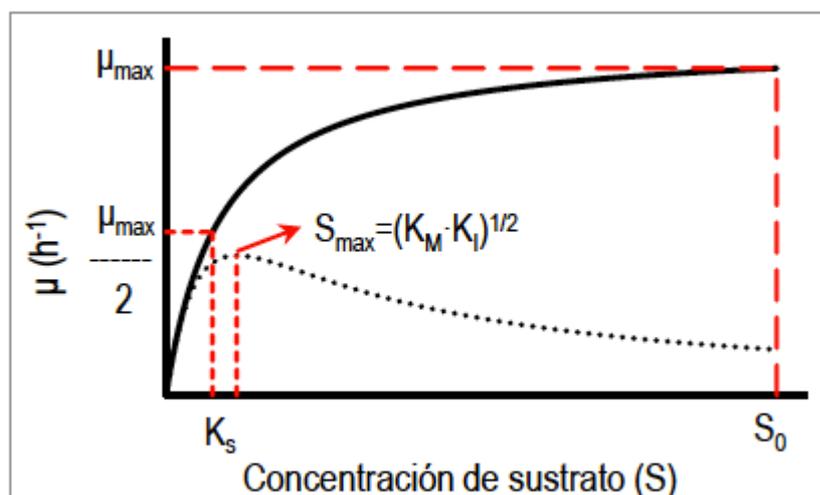
reacción en respuesta a los incrementos de concentración de sustrato son cada vez menores; finalmente se alcanza un punto donde los incrementos de velocidad son despreciables frente a los incrementos de sustrato; en este punto alcanzamos la velocidad máxima u_{\max} de reacción cuando la aceleración se hace igual a cero. (Blanco Paz, 2016)

2.7.2 Constante de crecimiento (K_s)

La constante de crecimiento se define como la concentración a la cual la velocidad específica de crecimiento de la levadura corresponde a la mitad de su valor máximo, es un indicador de la velocidad con que el sustrato es asimilado por el microorganismo. Depende de factores como composición del medio, condiciones de temperatura y pH. (Paz Blanco, 2016)

La constante de Monod para el crecimiento (K_s) es la concentración de sustrato a la cual la tasa de crecimiento de bacterias es la mitad de la tasa máxima de crecimiento. Esta constante está relacionada con el transporte de sustrato por la membrana celular permitiendo el crecimiento y reproducción. (Lerkkasemsaan & Lee, 2018)

Ilustración 9. Velocidad de crecimiento celular y concentración de sustrato para la determinación de las constantes de crecimiento para la ecuación de Monod



Fuente: (Dútan Mora, 2014)



Universidad de Cuenca

2.8 Métodos de análisis cinéticos para la determinación de K_s y U_{max}

2.8.1 Modelos de análisis cinético por ajuste de regresión lineal

La metodología de regresión lineal es extensamente utilizada en cinética enzimática y microbiana, los datos se grafican de tal manera que en el *eje x* se representa la variable independiente y en el *eje y* la variable dependiente, la línea trazada por regresión lineal se elige para minimizar la suma de los cuadrados de las distancias de los puntos a partir de esa línea. Algunos métodos de linealización utilizados son: Lineaweaver – Burk ($1/u$ versus $1/S$), Eadie – Hofstee (u versus u/S), Hanes Woolf (S/u versus S). (Lira Silva & Jasso Chávez, 2013)

Los métodos antes mencionados se pueden aplicar a la ecuación 1, para determinar la K_s y μ_{max} a partir de la pendiente y el intercepto.

Para la determinación de la velocidad de reacción (u), se aplica la diferencia entre los logaritmos de las tasas de generación de biomasa inicial (X_o) y final (X_L), dividido para la diferencia entre el tiempo final (t_i) de crecimiento y el tiempo inicial (t_o)

Ecuación 2. Ecuación para el cálculo de la velocidad de reacción en función de la generación de biomasa

$$\mu = \frac{(\ln X_L - \ln X_o)}{t_i - t_o}$$

Fuente: (Ariyajaroenwong, Laopaiboon, Salakkam, Srinophakun, & Laopaiboon, 2016)

2.8.1.1 Lineweaver – Burk

El método de Lineweaver – Burk permite estimar los valores de los parámetros μ_{max} y K_s , a partir de relaciones lineales, donde tenemos $\frac{1}{\mu}$ en función de $\frac{1}{S}$. Se toman los inversos de ambos miembros de la ecuación de Monod, y se tiene que:

Ecuación 3. Linealización de Lineweaver - Burk

$$\frac{1}{\mu} = \frac{K_s}{\mu_{max}} \cdot \frac{1}{S} + \frac{1}{\mu_{max}}$$



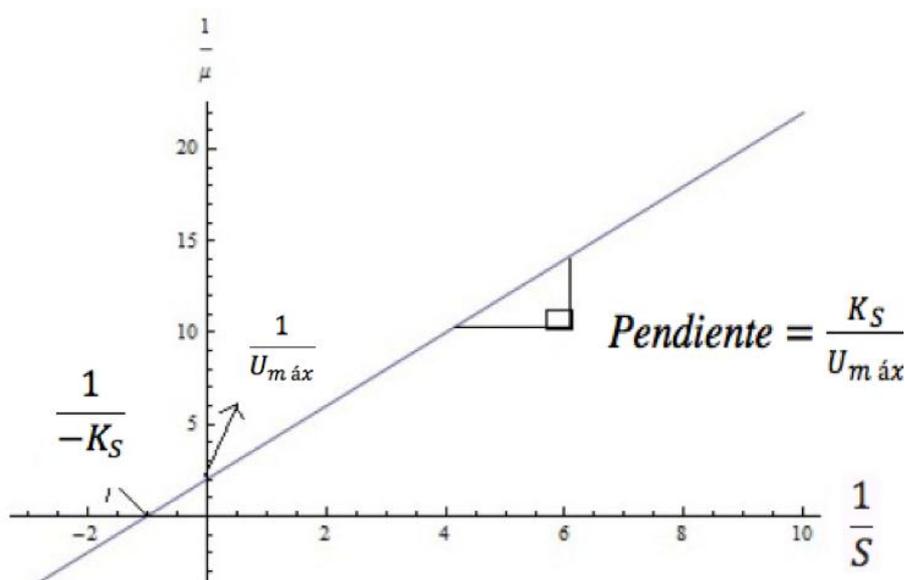
Universidad de Cuenca

En la ecuación 3 se observa que tiene la forma de una ecuación lineal ($y = mx + b$), con los siguientes términos:

$$m = \frac{K_S}{\mu_{max}}, b = \frac{1}{\mu_{max}}$$

Lo cual requiere que se conozca $\frac{1}{\mu}$ y $\frac{1}{S}$ para poder hacer la estimación de la pendiente m y la ordenada a la origen b , haciendo uso de la metodología de regresión lineal para conocer los valores. (Trinidad Bello, 2014)

Ilustración 10. Modelo de Lineweaver - Burk



Fuente: (Trinidad Bello, 2014)

2.8.1.2 Hanes Woolf

El modelo cinético de Hanes Woolf está representado por la siguiente ecuación:

Ecuación 4. Linealización Hanes Woolf

$$\frac{S}{\mu} = \frac{K_S}{\mu_{max}} + \frac{1}{\mu_{max}} * S$$

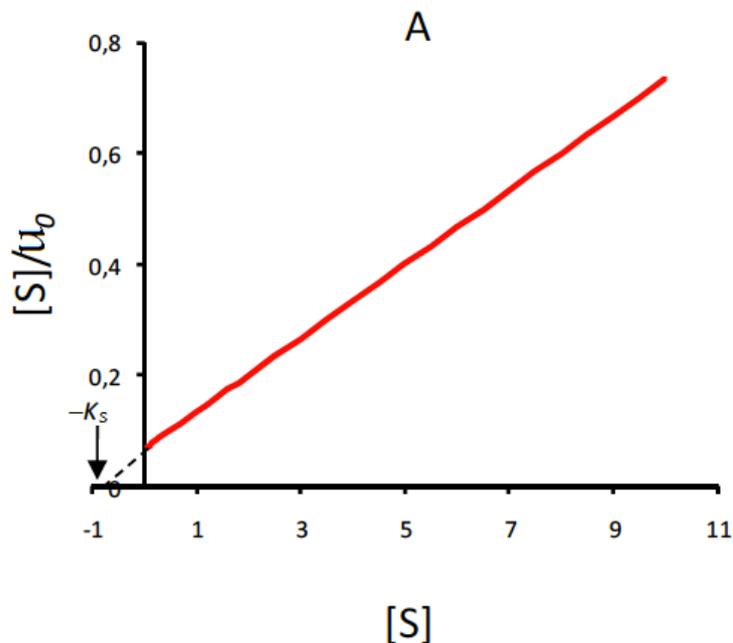
Gráficamente está representado en el eje x sustrato y en el eje y $\frac{S}{\mu}$, el corte de la ordenada al origen es $\frac{K_S}{\mu_{max}}$, la pendiente es $\frac{1}{\mu_{max}}$ y el corte con el eje x se produce en el valor de $-K_S$. A partir de la pendiente se puede calcular μ_{max} así



Universidad de Cuenca

como también podemos obtener K_s despejando del valor del eje y al origen. (Lodeiro, 2015)

Ilustración 11. Representación del modelo de regresión lineal Hanes Woolf



Adaptado de: (Lodeiro, 2015)

2.8.1.3 Eadie Hofstee

El modelo de Eadie Hofstee se obtiene al multiplicar ambos miembros de la ecuación del modelo de Lineweaver – Burk por $(\mu$ y $\mu_{max})$ y arreglando se obtiene la siguiente ecuación:

$$\frac{\mu * \mu_{max}}{\mu} = \frac{K_s}{\mu_{max}} * \frac{\mu * \mu_{max}}{S} + \frac{\mu * \mu_{max}}{\mu_{max}}$$

$$\mu_{max} = \frac{\mu}{S} * K_s + \mu$$

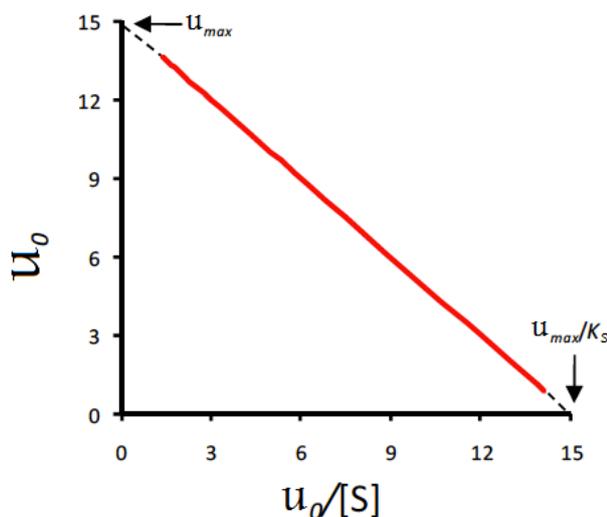
Ecuación 5. Linealización de Eadie Hofstee

$$\mu = \mu_{max} - \frac{\mu}{S} * K_s$$

En la ecuación 5 el eje x está representado por $\frac{\mu}{S}$ y el eje y por μ , obteniendo una recta cuya ordenada al origen es μ_{max} y su pendiente es $-K_s$. (Lodeiro, 2015)



Ilustración 12. Representación del modelo de regresión lineal de Eadie Hofstee



Adaptado de: (Lodeiro, 2015)

2.9 Cuantificación de biomasa y consumo de sustrato

La cuantificación de biomasa es una de las variables más importantes dentro de un bioproceso, ya que el valor de la misma nos lleva a la comprensión de la eficiencia del proceso, los métodos comunes para la cuantificación son métodos directos, basados en el número de células o en el peso celular. (Arnáiz Franco, Isac Oria, & Lebrato Martínez, 2000)

2.9.1 Método peso seco

El método de peso seco, se conoce también como método gravimétrico que permite cuantificar la biomasa directamente. La cantidad de biomasa existente en una muestra puede ser medida en términos de peso seco por unidad de volumen, las células se separan del líquido ya sea por centrifugación o filtración. Este método no cuantifica únicamente microorganismos activos, sino microorganismos muertos, material inerte y materia orgánica adsorbida. El peso se obtendrá por la diferencia entre los tubos con muestra y tubos vacíos que están sometidos a condiciones de 105°C por 72h en la estufa. (Arnáiz Franco et al., 2000)

2.9.2 Espectroscopía UV- Visible

La espectroscopía UV – Visible es un método frecuentemente utilizado para análisis químico, se basa en la medición de propiedades ópticas que parten de la interacción de la radiación electromagnética con la materia como la



Universidad de Cuenca

absorción y emisión de luz, identificándose como luz aquella porción del espectro electromagnético, es decir las regiones ultravioleta y visible. (Millán, 2016)

La espectroscopía UV – Visible está en un rango de longitud de onda de 190 – 800nm, estudia los cambios de niveles de energía que surgen dentro de la molécula debido a la transferencia de electrones. (Kumar, 2006) Mediante la medición de la absorbancia a una determinada longitud de onda, es posible determinar la concentración de un analito dado, si se compara con las absorbancias de soluciones patrón conocidas. (Millán, 2016)

La ley que rige los aspectos cuantitativos de la absorción de luz es *la ley de Lambert - Beer*, la misma que establece que bajo ciertas condiciones experimentales fijas como la longitud de onda, temperatura, entre otras, la absorbancia de la especie química varía directamente con la concentración. (Millán, 2016)

La expresión matemática que expresa la ley de *Lambert – Beer* es:

Ecuación 6. Ley Lambert - Beer

$$A = C \cdot \epsilon \cdot L$$

Fuente: (Harris & Berenguer Navarro, 2007)

Donde:

A = Absorbancia de la muestra (adimensional)

C = Concentración del cromóforo (molar)

L = Longitud del paso óptico que contiene la muestra. (cm)

ϵ = Absorción molar. Depende del cromóforo, de la longitud de onda y de las condiciones de medida como pH, temperatura, etc. ($M^{-1} \cdot cm^{-1}$)



El trabajo investigativo busca determinar variables cinéticas en el proceso fermentativo del mucílago de cacao CCN – 51, aplicando como catalizador la levadura *S. Cerevisiae*, el mismo que se llevará a cabo en el reactor discontinuo tipo Batch con el que cuenta la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad de Cuenca en el laboratorio del tecnológico; las condiciones de operación fueron establecidas en investigaciones previas y se ha tomado como referencias los datos obtenidos de pH, temperatura y velocidad de agitación, por (Guncay Buestán & Silva Ibarra, 2018). La identificación de los parámetros cinéticos: velocidad de reacción y constante de crecimiento, se realiza con diferentes concentraciones de azúcares partiendo de 17° Brix, una dilución a 8,5°Brix y dos concentrados a 21 y 24°Brix, a partir de los cuales se obtienen datos experimentales que permiten la aplicación de métodos matemáticos para la obtención de los mencionados parámetros. El valor máximo valor de °Brix que se aplica es de 24, debido que a concentraciones superiores la levadura no metaboliza los azúcares e inhibe el proceso fermentativo para la producción de bioetanol, es decir es preferible trabajar en concentraciones diluidas.

Los modelos matemáticos que se usarán en la investigación experimental son: Lineweaver – Burk, Hanes Woolf, Eadie Hofstee; los mencionados modelos permitirán la linealización matemática, mediante la cual se obtendrán los parámetros cinéticos planteados en la investigación. Se realizará la respectiva comparación de los resultados entre los diferentes modelos presentados.

3.1 Materia Prima

3.1.1 Mucílago de cacao

En la presente investigación se utilizará el cacao CCN-51, que es un híbrido descubierto en 1965 y presenta mejores características como alta productividad, es resistente a diferentes enfermedades y son mazorcas y semillas grandes; de esta variedad se obtiene el mucílago del cual se conoce las propiedades físico – químicas, estas han sido obtenidas por Quizhpi en el año 2016, “mediante los métodos de espectrofotometría UV-Visible y absorción atómica”.



Universidad de Cuenca

3.1.1.1 Georeferenciación de la recolección del cacao

El cacao CCN – 51 se recolectó en la Zona 6 del Ecuador, en la provincia del Cañar, cantón la Troncal, vía Zhucay, la georeferencia es 2°29'25''S y 79°19'3''O aproximadamente a 2 horas 40 minutos de la Universidad de Cuenca. (Serpa Nieves & Tenesaca Castillo, 2018)

3.1.2 Levadura

La levadura que se utilizará para la experimentación es la *Saccharomyces Cerevisiae*, de la marca Levapan, común en el mercado panadero. Es un producto orgánico y biológico que se presenta en bloques de 500g empacados en caja corrugada de 50 unidades, tiene una vida útil de 30 días en condiciones óptimas de almacenamiento; tiene un composición de sólidos de 32 - 34% y una humedad de 66 - 68%. (Levapan, 2018)

3.1.3 Azúcar

El azúcar empleada para la experimentación es la marca “San Carlos”, tiene diferentes tipos de producciones, sin embargo la utilizada es la azúcar blanca granulada que tiene una concentración cercana al 100% de sacarosa. (SanCarlos, 2018)

“Es un producto sólido cristalizado, obtenido directamente del jugo de la caña de azúcar mediante procedimientos de clarificación, evaporación, cristalización, centrifugación y secado”. (SanCarlos, 2018)

3.2 Métodos

3.2.1 Extracción del mucílago de cacao

3.2.1.1 Materiales y equipos

En la extracción del mucílago de cacao CCN - 51, se utilizaron las materiales y equipos detallados en la tabla 2.

Tabla 3. Materiales y equipos utilizados en la extracción del mucílago del cacao CCN-51

Materiales	Equipos
Cuchillo	Termómetro
Recipientes plásticos	Estufa industrial
Recipientes estériles de 4 Litros	Mezclador de paletas
Baldes plásticos	Fluidificador
Ollas de acero inoxidable	Refractómetro
Paletas de agitación	

Fuente: (Serpa Nieves & Tenesaca Castillo, 2018)



3.2.1.2 Procedimiento para la recolección y extracción del mucílago de cacao

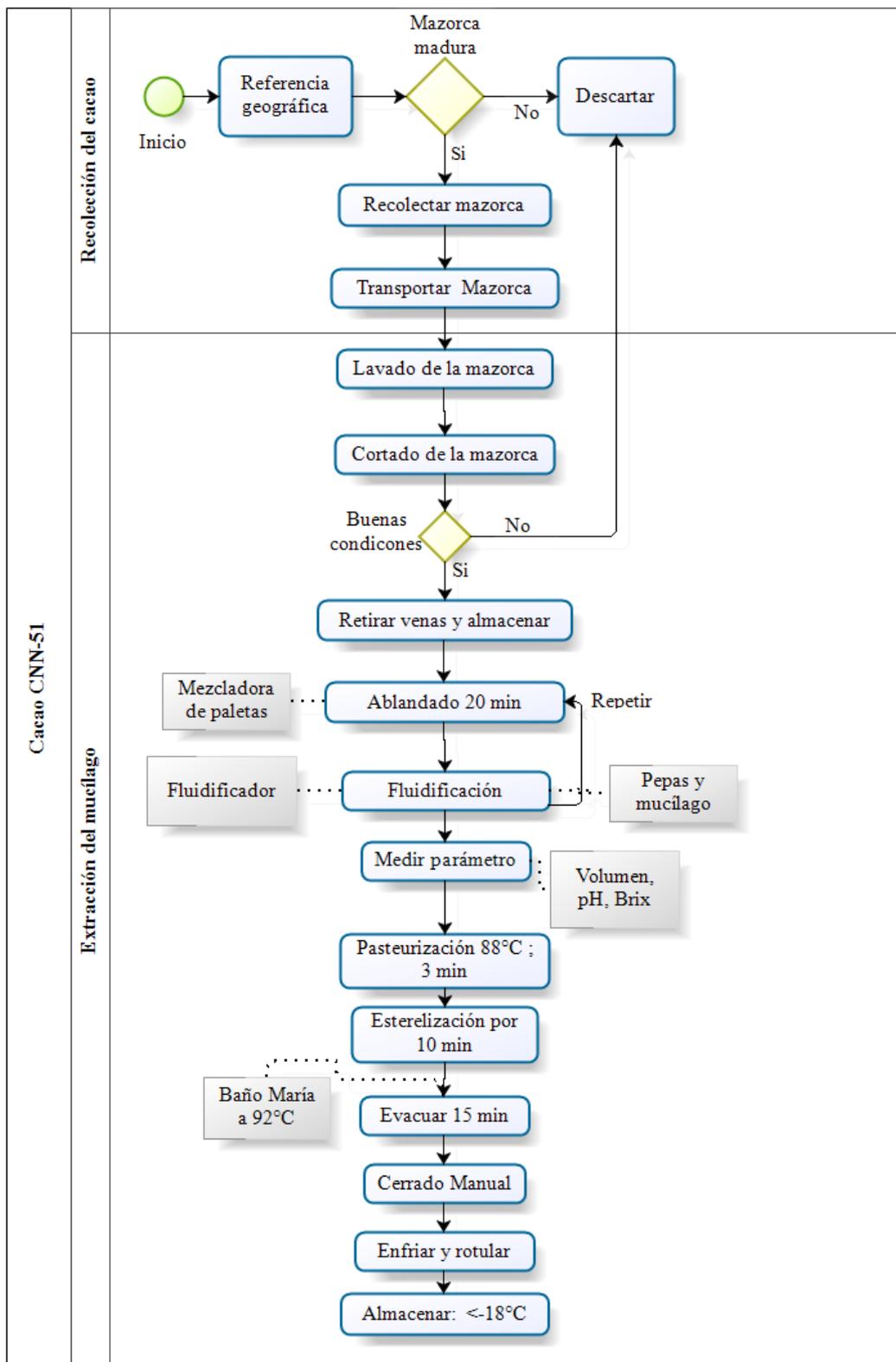


Ilustración 13. Obtención y extracción del mucílago de cacao CCN-51

Elaborado por: Autores



Universidad de Cuenca

3.2.2 Determinación de la concentración de azúcares en el mucílago de cacao

Los carbohidratos son polihidroxi aldehídos, polihidroxi cetonas o compuestos que a través de hidrólisis se convierten en moléculas más sencillas comúnmente denominadas azúcares, que se denominan unidades monoméricas – monosacáridos ó diméricas – disacáridos. Entre los azúcares más importantes están: glucosa, fructosa, galactosa, maltosa, lactosa, sacarosa y trehalosa. (Gómez & Samara, 2014)

La glucosa es un monosacárido con fórmula molecular $C_6H_{12}O_6$ es una hexosa que contiene 6 átomos de carbono y es una aldosa, contiene un grupo carbonilo en el extremo de la molécula. La D-glucosa es un azúcar reductor que se encuentra libre en el cuerpo y también se absorbe de fuentes externas como frutas y vegetales, la mayor parte de la glucosa está presente como polímero no digestible (celulosa), la glucosa se puede producir a partir de hidrólisis de almidón por vía enzimática. (Gómez & Samara, 2014)

Los carbohidratos son los precursores para llevar a cabo los procesos de fermentación alcohólica, la concentración inicial de glucosa ejerce un efecto directo sobre el metabolismo celular durante la fermentación y a altas concentraciones se convierte en un fuerte inhibidor. (Aguilar Uscanga, Strehaiano, Delia, & Escudero, 2015)

°**Brix**: el °Brix o grados Balling es una escala que presenta el hidrómetro y permite determinar la concentración de azúcar que contiene una muestra, cada °Brix indica 1 gramo de sacarosa por cada 100 gramos de líquido. (Nieto Galarza, 2009)

Para la realización de la corrección de °Brix se puede aplicar la siguiente fórmula:

Ecuación 7. Corrección de °Brix

$$x = \frac{100 (Bx_2 - Bx_1)}{(100 - Bx_2)}$$

3.2.2.1 Procedimiento para la concentración de azúcares del mucílago de cacao

1. Luego de descongelar el mucílago de cacao se procede a medir la concentración de azúcares con el refractómetro.



Universidad de Cuenca

2. En función de los °Brix medidos se procede a cuantificar la cantidad de azúcar que se debe añadir a partir de la ecuación 7 para incrementar la concentración a 21, 24 °Brix
3. Pesarse y agregar la cantidad de azúcar obtenida mediante la ecuación 7
4. Homogenizar la muestra y medir °Brix para verificar si se obtuvo la concentración deseada

3.2.2.2 Diagrama del procedimiento para la concentración de azúcares

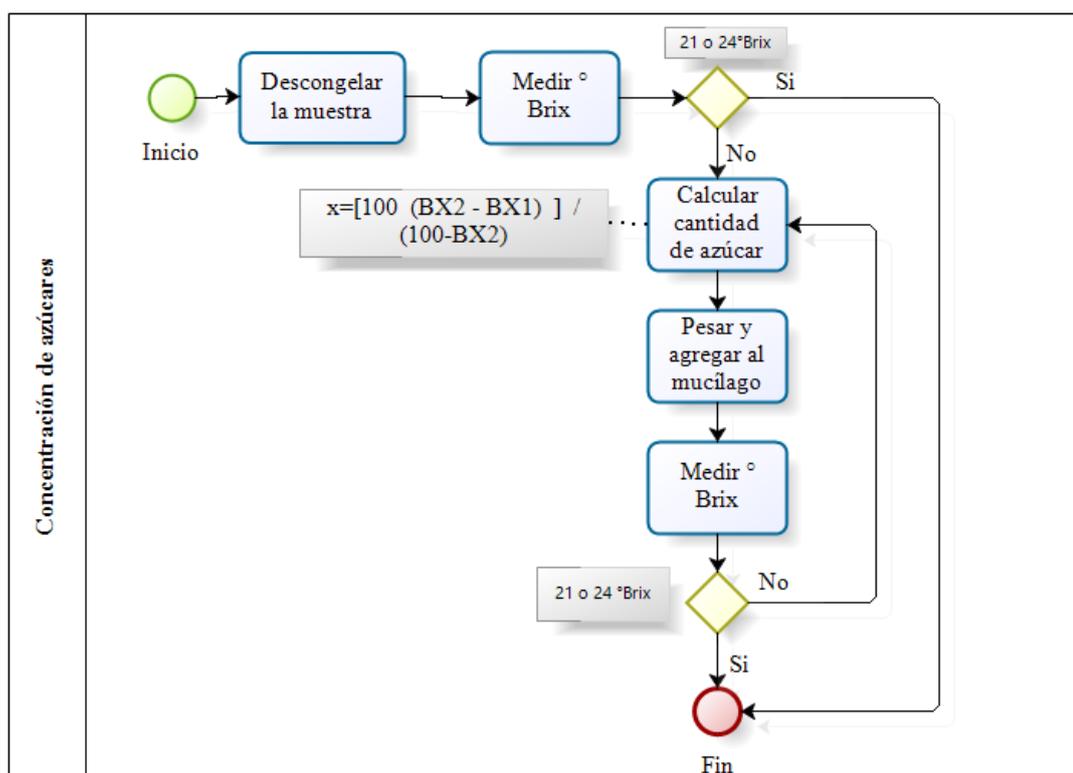


Ilustración 14. Procedimiento para la concentración de azúcares

Elaborado por: Autores

3.2.3 Fermentación Discontinua

Es un proceso discontinuo o Batch, que se puede considerar como un sistema cerrado, se utiliza en gran magnitud en la industria, a tiempo cero la muestra esterilizada de nutrientes se inocula con microorganismos permitiendo que se lleve a cabo la fermentación en condiciones óptimas. A lo largo de la fermentación no se adiciona nada, excepto ácidos o bases para el control de pH. La concentración de sustrato, la composición del medio, concentración de



Universidad de Cuenca

biomasa y concentración de metabolitos cambia continuamente como resultado del metabolismo celular. (Dútan Mora, 2014)

3.2.3.1 Materiales, Equipos y Reactivos

Tabla 4. Materiales, equipos y reactivos para la fermentación

Reactivos y Materia prima	Equipos	Materiales
Mucílago de cacao CCN-51	Reactor tipo Batch Biotron GS Single Vessel	Recipientes de acero
HCl 1N NaOH 1N	Cocineta a gas Refractómetro	Paleta de agitación Probeta 1000ml
Levadura marca Levapan Azúcar Agua destilada Nitrógeno líquido	Termómetro	

Fuente: (Serpa Nieves & Tenesaca Castillo, 2018)

3.2.3.2 Procedimiento para la fermentación discontinua

3.2.3.2.1 Preparación de la materia prima

La materia prima implementada en la investigación es el mucílago de cacao CCN-51, el cual se ha obtenido mediante ablandamiento y fluidificación y para la conservación de sus características se almacenó en congelación. Debido al tipo de almacenamiento es indispensable seguir los siguientes pasos:

1. Descongelar el mucílago, la botella que contiene la muestra se retira de congelación tres días previos a la realización del experimento.
2. Realizar la medición de los °Brix, se trabaja con 8,5; 17; 21 y 24°Brix, si el valor medido es superior al requerido se adiciona agua destilada y si es menor se adiciona azúcar hasta alcanzar el valor deseado
3. Ajustar la temperatura utilizando una cocineta con un recipiente de acero inoxidable, es recomendable incrementar 2°C al valor deseado.
4. Medir el volumen de mucílago a utilizar, este valor es de 2L para cada experimento.



3.2.3.2.1.1 Diagrama del procedimiento para la preparación de materia prima (mucílago)

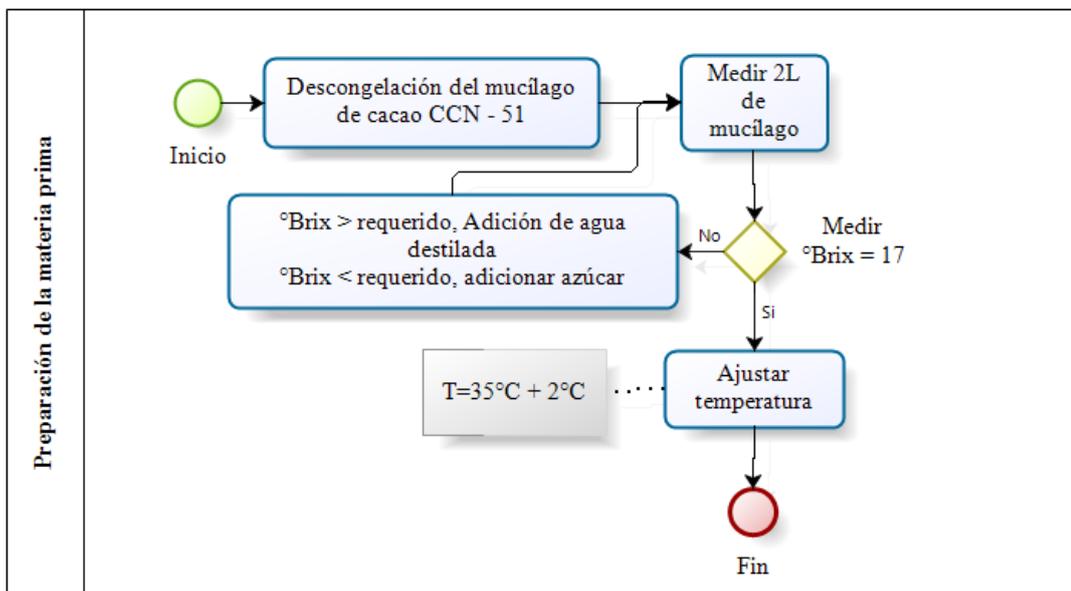


Ilustración 15. Procedimiento para preparar la materia prima a usar durante la fermentación

Elaborado por: Autores

3.2.3.2.2 Acondicionamiento del reactor

1. Realizar la preparación del reactor Batch, este consta de una serie de tubos, tanque donde se realiza la fermentación, motor que da movimiento a las aspás del reactor y sensores: pH, temperatura y DO
2. Disponer los parámetros establecido en la tesis de Guncay & Silva, 2018, descritos en la siguiente tabla:

Tabla 5. Parámetros de ajuste del reactor Batch

Parámetro	Valor
pH	4
Temperatura (°C)	35
Velocidad de agitación (rpm)	250

Fuente: (Guncay Buestán & Silva Ibarra, 2018)



3.3.3.2.1 Diagrama del procedimiento para el acondicionamiento del reactor

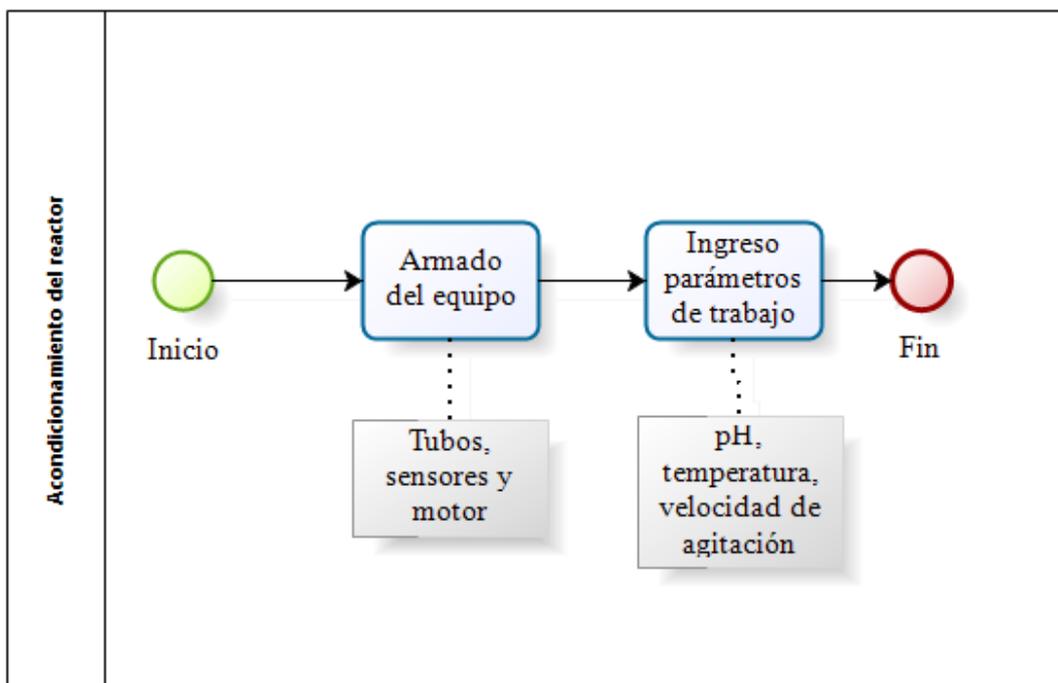


Ilustración 16. Procedimiento para el acondicionamiento del reactor

Elaborado por: Autores

3.2.3.2.3 Inoculación de la levadura

1. Luego de ajustar los parámetros en el equipo, se adiciona 2 L de mucílago de cacao CCN – 51, el cual es el sustrato para la fermentación. El acondicionamiento de los parámetros es automático por el equipo, excepto el pH que se debe regular con la adición de NaOH 1N o HCl 1N, para aumentar y reducir pH respectivamente. (Serpa Nieves & Tenesaca Castillo, 2018)
2. Adicionar la levadura 3g/L (inocular), valor establecido en la tesis Guncay & Silva
3. Accionar el flujo de nitrógeno.

3.3.3.3.1 Diagrama para el procedimiento de la inoculación de la levadura

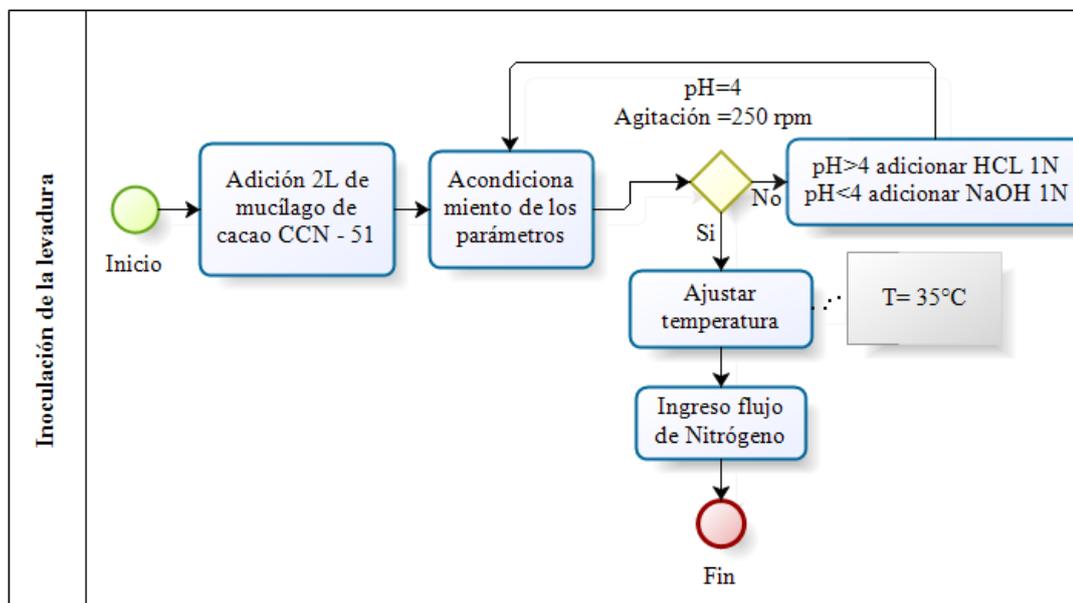


Ilustración 17. Procedimiento de inoculación de la levadura

Elaborado por: Autores

3.2.3.2.4 Fermentación

La fermentación se da en un reactor tipo Batch, el tiempo de duración de este proceso dependerá de la concentración de azúcares de la materia prima y se realizará con una concentración de levadura de 3g/L; la toma de muestras será cada seis hora donde se medirá los °Brix, parámetro que nos ayuda a controlar el desarrollo de la fermentación; cuando se obtiene tres valores repetitivos de lectura de °Brix se da por terminado el experimento.

3.2.4 Métodos para cuantificación de biomasa

3.2.4.1 Método analítico peso seco

La cuantificación de la biomasa o comunidad microbiana dispone de diferentes métodos. Algunos de estos métodos son muy sencillos y no requieren de manipulaciones complejas; otros métodos son más complejos para lo cual se utiliza medidas indirectas. (Arana, Orruño, & Barcina, 2014)



Universidad de Cuenca

El peso seco (contenido de sólidos) por unidad de volumen de las células que se hallan en suspensión, se obtiene por el secado de un volumen de muestra en una estufa a 105°C, hasta obtener finalmente un peso constante. La ventaja de esta técnica es que se utiliza para la cuantificación de grandes volúmenes de muestra, esto se debe a que diferencias del orden de miligramos representan el peso de un gran número de bacterias. Este método es válido y muy utilizado con cultivos puros (levaduras, etc) (Arana et al., 2014)

La cantidad de biomasa total presente en la muestra se calcula como la diferencia entre el peso final del tubo de ensayo con la muestra y el peso inicial del tubo de ensayo, dividida entre el volumen de la muestra tomada. (Vega Arredondo & Voltolina, 2007)

3.2.4.1.1 Materiales y Equipos

Tabla 6. Materiales y equipos para cuantificar la biomasa por el método seco

Materiales	Equipos
Pipeta volumétrica de 5ml	Centrífuga 80 - 3
Tubos de ensayo	Desecador Gander M.T.N
Vasos de precipitación 25ml	Estufa Memmert
	Balanza analítica Mettler Toledo

Fuente: (Serpa Nieves & Tenesaca Castillo, 2018)

3.2.4.1.2 Procedimiento del método analítico peso seco

1. Tomar 5ml de muestra extraída del reactor, las muestras se toman por triplicado para reducir el error.
2. Poner en un tubo de vidrio, anticipadamente pesado y secado
3. Colocar en la centrífuga durante 10 minutos a 4000 rpm
4. Separar el sobrenadante
5. El contenido que permanece en el tubo, se pone en la estufa a 105°C durante 72 horas
6. Una vez concluido el experimento se saca las muestras y se coloca en el desecador aproximadamente por 1 hora
7. Pesar tubo con muestra seca
8. Calcular la cantidad de biomasa con la siguiente fórmula:



$$\text{Concentración de Biomasa} = \frac{P_f - P_i}{V_m}$$

Donde:

P_i = Peso del tubo limpio y seco (g)

P_f = Peso del tubo más la muestra luego de permanecer 72 en la estufa y 1 en el desecador (g)

V_m = Volumen de la muestra (ml)

3.2.4.1.3 Diagrama del procedimiento del método analítico peso seco

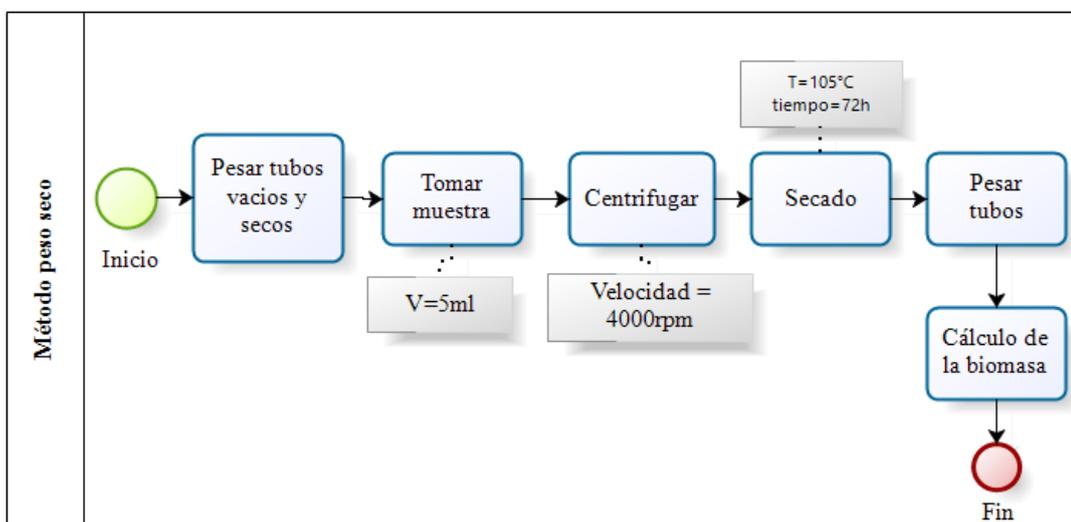


Ilustración 18. Procedimiento para cuantificación de la biomasa por el método peso seco

Elaborado por: Autores

3.2.4.2 Liofilización

La liofilización es la eliminación de agua por sublimación del estado de congelamiento (hielo). Este proceso tiene como primer paso congelar la muestra y posteriormente someter a alto vacío, por lo que el hielo del agua se sublima (evaporación directa, sin fundirse). El vapor de agua que se libera generalmente se atrapa en la superficie de un condensador a bajas temperaturas.



Universidad de Cuenca

La sublimación es la transición directa entre el estado sólido al estado gaseoso sin fusión, ocurre en un rango definido de temperaturas y presiones dependiendo de la muestra analizada

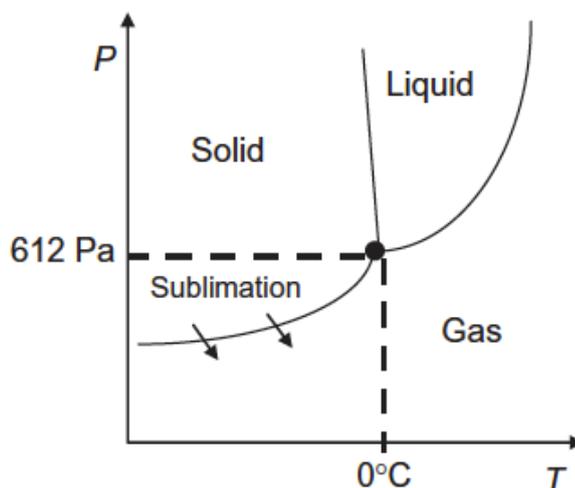


Ilustración 19. Diagrama del punto triple del agua

Fuente: (Eduardo & Alzate, n.d.)

El diagrama nos indica la fase del agua pura en donde la sublimación del hielo de agua, puede ocurrir solo si la presión de vapor y la temperatura son $0,01^{\circ}\text{C}$ debajo del punto triple del agua, es decir, debajo de $611,73\text{ Pa}$ (Eduardo & Alzate, n.d.)

3.2.4.2.1 Materiales, Equipos y reactivos

Tabla 7. Materiales, equipos y reactivos para la cuantificación de biomasa por el método de liofilización

Materiales	Equipos	Reactivo
Tubos de 7ml	Liofilizador	Agua destilada
Vasos metálicos	Balanza analítica Mettler Toledo	Nitrógeno Líquido
Bandejas metálicas	Centrífuga 80-30	Nitrógeno Gaseoso
Mucílago de cacao CCN-51	Tanque de Nitrógeno líquido	
Piseta		
Pipeta volumétrica de 5ml		

Elaborado por: Autores



Universidad de Cuenca

3.2.4.2.2 Procedimiento de liofilización

1. Tomar 5 ml de la muestra y colocar en los tubos de ensayos plásticos de 7ml previamente lavados y secados.
2. Centrifugar la muestra a 400 rpm durante 10 minutos.
3. Desechar sobrenadante.
4. Almacenar en el tanque de nitrógeno líquido para su conservación.
5. Descongelar las muestras.
6. Pesar los vasos metálicos limpios y secos.
7. Colocar la muestra en los recipientes desechando toda la muestra en su totalidad y en caso de quedar residuos de muestra colocar agua destilada para su limpieza total.
8. Colocar los vasos metálicos en las bandejas del liofilizador, luego poner las bandejas dentro del liofilizador.
9. Ajustar las condiciones de trabajo del liofilizador.
10. Retirar las muestras luego de alcanzadas las condiciones propuestas y pesar.
11. Realizar los cálculos de biomasa obtenida mediante la ecuación 8.



3.2.4.2.3 Diagrama del procedimiento de liofilización

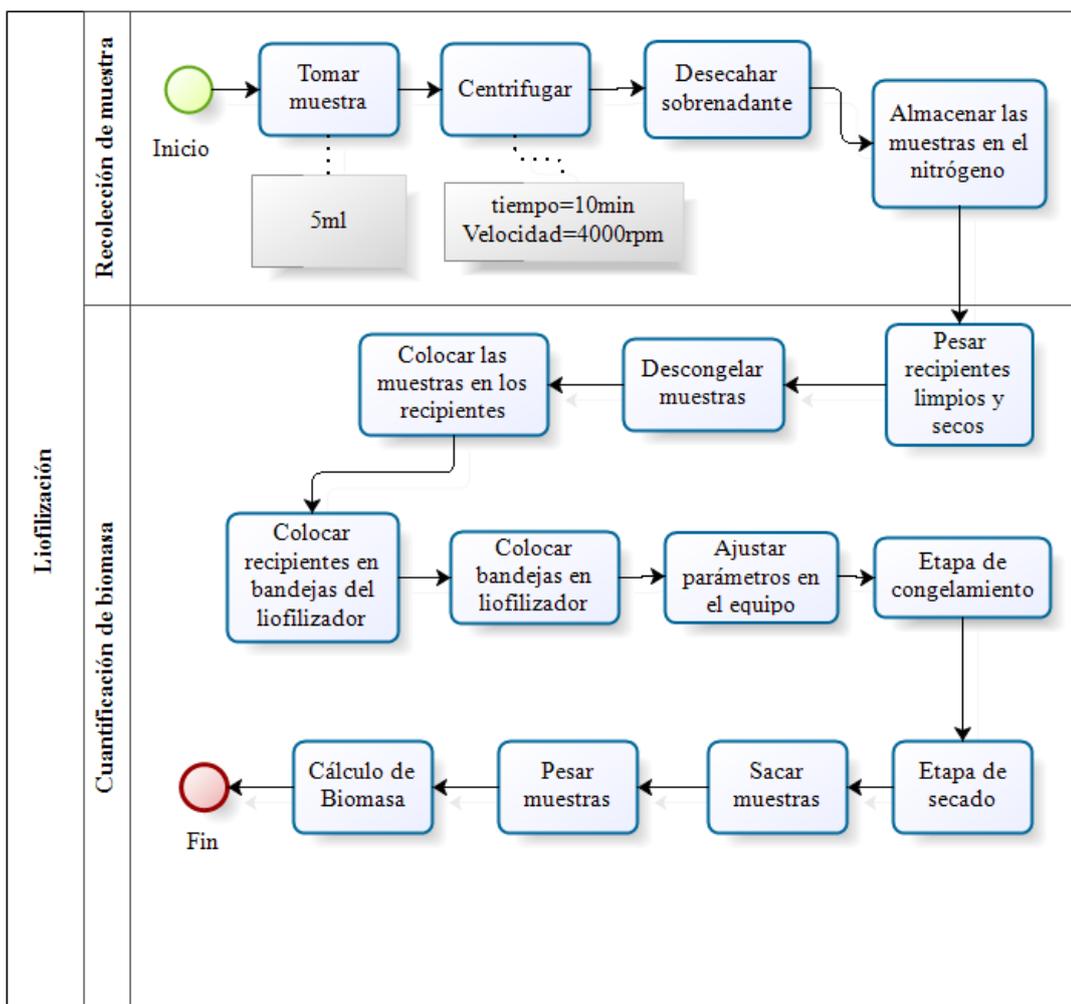


Ilustración 20. Procedimiento para la cuantificación de biomasa por el método de liofilización

Elaborado por: Autores

3.2.5 Fundamento del método fenol - ácido sulfúrico (Método de DuBois)

El método colorimétrico para la cuantificación de la concentración de carbohidratos más utilizado es el desarrollado por DuBois, ya que permite la cuantificación de azúcares como monosacáridos, oligosacáridos y polisacáridos; a su vez presenta sensibilidad, rapidez, estabilidad, reproducibilidad y facilidad del procedimiento. (López Legarda et al., 2017)

La interacción entre el ácido sulfúrico y los polisacáridos hidrolizan a monosacáridos, provocando la deshidratación de los carbohidratos; a partir de esta reacción se forman derivados del furfural y el 5-hidroximetilfurfural (HMF).



Universidad de Cuenca

La presencia de fenol y su interacción con el HMF permite la formación de complejos, dando como resultado la coloración de la solución y consecuentemente la cuantificación de los carbohidratos mediante espectrofotometría. (López Legarda et al., 2017)

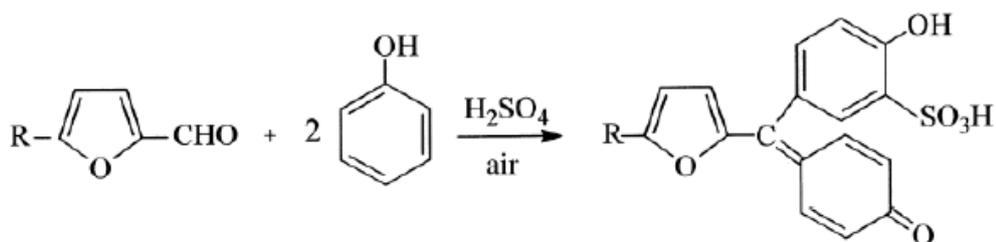


Ilustración 21. Reacción general Método Fenol - Ácido Sulfúrico

Adaptado de: (López Legarda et al., 2017)

Los complejos formados presenta una coloración amarillo – naranja cuya intensidad es proporcional a la cantidad total de carbohidratos presentes en la muestra, el rango de longitud de onda en la que se puede medir la absorbancia de la muestra es de 492nm. (Garzón Castaño & Hernández Londoño, 2009)

La reacción generada está en función de la estructura de los azúcares presentes en la muestra, factor que involucra la elaboración de la curva patrón con el azúcar a analizar. La concentración de glucosa de la muestra que se desea analizar se determina en función de una curva de calibración que se forma con la absorbancia y diferentes concentraciones realizadas con glucosa como estándar. La lectura del blanco en el espectrofotómetro se realiza con agua destilada y la lectura de las muestras en análisis se realizará por triplicado para mayor exactitud. (Capelo Armijos & Pérez Ulloa, 2011)

El método fenol ácido sulfúrico requiere de una curva de calibración, donde se realiza la medición de la absorbancia a diferentes concentraciones de azúcar, estos patrones debe tener el mismo tratamiento que se da a las muestras en análisis.

Una vez identificado los datos se grafica la concentración frente a la absorbancia. El cálculo de la concentración de las muestras analizadas se debe realizar con la ecuación 9



Universidad de Cuenca

Ecuación 9. Ecuación de Linealidad dada por la curva de calibración

$$y = mx + b$$

Fuente: (Capelo Armijos & Pérez Ulloa, 2011)

Donde:

y = Absorbancia de las diluciones de la curva patrón

m= Pendiente, a partir de la ecuación de linealidad patrón

x= Valor desconocido

b= Intercepto, basado en la ecuación de linealidad de la curva patrón

3.2.5.1 Materiales, equipos y reactivos

Tabla 8. Materiales, equipos y reactivos para el método fenol - ácido sulfúrico

Materiales	Equipos	Reactivos
Tubos plásticos al vacío	Centrífuga 80 - 3	Agua destilada
Jeringuillas de 5ml	Tanque de nitrógeno líquido	H ₂ SO ₄ concentrado
Pipeta volumétrica de 5ml	Balanza analítica Mettler Toledo	Fenol al 5%
Micro pipeta 1ml	Espectrofotómetro de UV- Visible	Muestras en análisis
Balones de aforo de distintas capacidades		Agua destilada
Recipientes plásticos		
Vasos de precipitación		
Piseta		
Varilla de agitación		
Cinta de rotulación		
Tubos de ensayo de vidrio		
Gradillas para tubos		

Fuente: (Serpa Nieves & Tenesaca Castillo, 2018)

3.2.5.2 Procedimiento del método fenol - ácido sulfúrico

1. Tomar 5 ml de muestra vacutainer (no se requiere que estén sellados al vacío)
2. Centrifugar la muestra a analizar durante 10 minutos a 4000 rpm
3. Quitar el sobrenadante e inyectar al tubo vacutainer sellado al vacío para conservar la muestra



Universidad de Cuenca

4. Guardar las muestras en el nitrógeno líquido
5. Una vez terminado el experimento descongelar las muestras, para realizar el ensayo el mismo día
6. Realizar las diluciones necesarias (varias concentraciones) de las muestras para que puedan ser leídas por el espectrofotómetro
7. Medir y adicionar 2 ml de la solución de azúcares a cada tubo de ensayo
8. Medir y adicionar 1 ml de fenol al 5% a la solución de azúcares.
9. Medir y adicionar 5ml de H_2SO_4 concentrado.
10. Dejar en reposo durante 10 minutos.
11. Agitar los tubos de ensayo por unos 30 segundos, se presenta una reacción exotérmica por lo que es importante tener precaución.
12. Dejar tubos de ensayo durante 20 minutos en baño maría de agua fría.
13. Medir la absorbancia en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 490nm.
14. El ensayo se realiza por triplicado para verificar resultados.

3.2.5.3 Diagrama de flujo del procedimiento método fenol - ácido sulfúrico

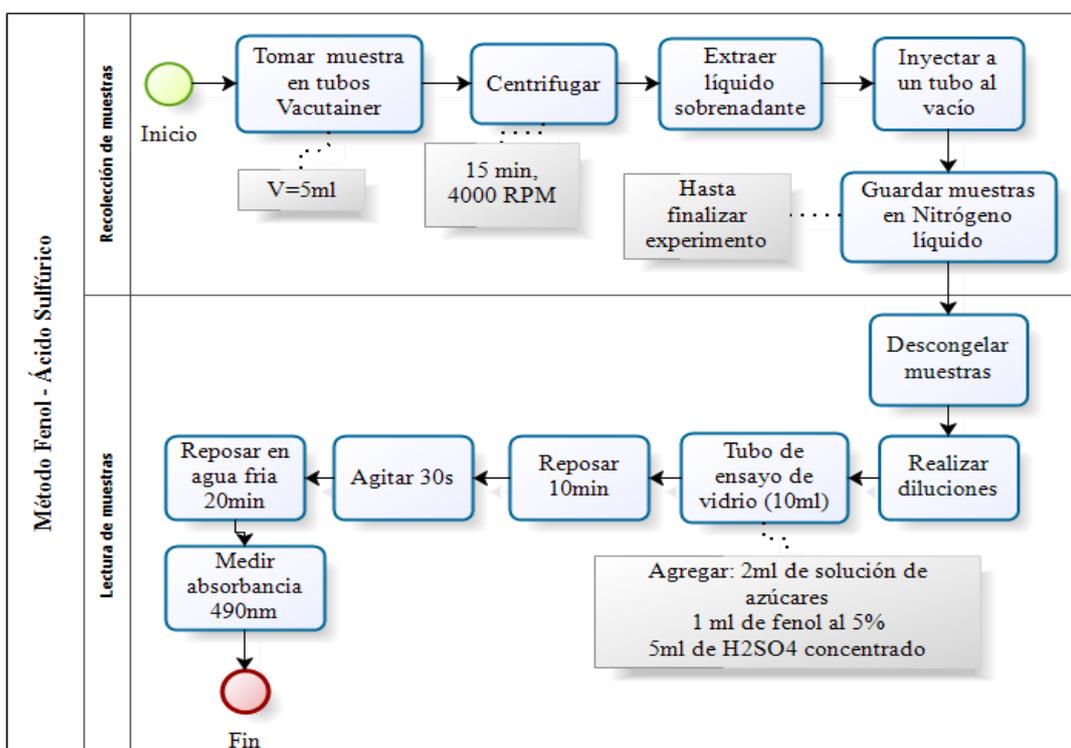


Ilustración 22. Procedimiento para el método fenol - ácido sulfúrico



3.2.5.4 Disoluciones para cuantificar azúcares

Disolución patrón: es un reactivo de concentración conocida con exactitud, estas disoluciones desempeñan una función principal en todos los métodos volumétricos y se pueden preparar mediante métodos directos e indirectos.

El método directo consiste en pesar exactamente un patrón primario, que se disuelve en un solvente adecuado y se lleva a un volumen final conocido en un matraz volumétrico; el método indirecto al no disponer de un patrón primario se prepara una solución de concentración aproximada del valorante y posteriormente se estima su concentración por normalización.

La solución patrón debe ser suficientemente estable para que solo sea necesario determinar una vez su composición, debe reaccionar rápidamente con el analito para reducir al mínimo el tiempo requerido entre las adiciones de reactivo y debe reaccionar en forma selectiva con el analito para que describa una reacción balanceada. (Universidad Politecnica de Valencia, 2014)

3.2.5.4.1 Procedimiento de las disoluciones

1. Sacar las muestras del tanque de nitrógeno y descongelarlas.
2. Tomar 1ml de muestra y diluir en función de la concentración de azúcar de la muestra.
3. Realizar varias diluciones en función de la lectura que se vaya a realizar.

Nota: En el presente trabajo de titulación se realizaron varias diluciones las cuales están presentadas en el anexo I, II, III, IV.

3.3 Modelos matemáticos

Los modelos matemáticos nos permiten a través de la linealización graficar los datos obtenidos por experimentación de biomasa y sustrato, con los cuales se obtendrá los parámetros cinéticos mediante los valores de los componentes de la ecuación como son la pendiente y el intercepto, así encontrando los valores de μ_{max} y K_S .

En la siguiente tabla, se muestra los modelos matemáticos:

Tabla 9. Resumen de los modelos matemáticos

Modelo	Ecuación	Eje X	Eje Y	Pendient	Intercept
--------	----------	-------	-------	----------	-----------



		e	o
Lineaweaver – Burk	$\frac{1}{\mu} = \frac{K_s}{\mu_{max}} \cdot \frac{1}{S} + \frac{1}{\mu_{max}}$	$\frac{1}{S}$	$\frac{1}{\mu}$
		$\frac{K_s}{\mu_{max}}$	$\frac{1}{\mu_{max}}$
Hanes Woolf	$\frac{S}{\mu} = \frac{K_s}{\mu_{max}} + \frac{1}{\mu_{max}} * S$	S	$\frac{S}{\mu}$
		$\frac{1}{\mu_{max}}$	$\frac{K_s}{\mu_{max}}$
Eadie Hofstee	$\mu = \mu_{max} - \frac{\mu}{S} * K_s$	$\frac{\mu}{S}$	μ
		$-K_s$	μ_{max}

Fuente: (Ariyajaroenwong et al., 2016)

Elaborado por: Autores

Donde:

μ_{max} = velocidad específica máxima de crecimiento y se expresa en h^{-1}

S = concentración de sustrato limitante del crecimiento y se expresa en g/L

μ = velocidad de aumento de la concentración celular por unidad de tiempo y se expresa en h^{-1}

K_s = constante de crecimiento de Monod y se expresa en g/L



4: ANÁLISIS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS

4.1 Parámetros para el proceso fermentativo

La investigación está basada en la determinación de los parámetros cinéticos μ_{max} y K_S del proceso fermentativo del mucílago de cacao, se utilizó una cantidad constante de levadura siendo 3g/L, parámetros en el rector de pH=4, temperatura=35°C y agitación 250rpm; para análisis de resultados se utilizó el método de ajuste por regresión lineal cuyas variables consideradas son cuantificación de consumo de sustrato (S) y generación de biomasa; en el estudio realizado se identificó que a mayor concentración de azúcar en el mucílago de cacao para el proceso fermentativo, influye de manera negativa en la generación de biomasa, este factor se compara con la investigación realizada por (Peña & Arango, 2009) manifiesta que a mayor concentración inicial de sustrato se inhibe la reacción para la producción de biomasa.

El método gráfico de regresión lineal requiere distintos puntos es por ello, que se realizó el proceso fermentativo con diferentes concentraciones de azúcar. (Ariyajaroenwong et al., 2016) Partiendo a una concentración de 17 °Brix inicialmente y a lo largo de la experimentación se utilizó concentraciones de 24, 21 y 8,5 °Brix, con estos puntos se realizó la gráfica mediante los diferentes métodos de linealización Lineaweaver-Burk, Eadie Hofstee, Hanes Woolf dándonos como resultados una ecuación lineal y posteriormente obteniendo los parámetros cinéticos de estudio.

4.2 Análisis y resultados de la cuantificación de sustrato en el transcurso de la fermentación anaerobia con levadura *S. Cerevisiae*

La cantidad de sustrato contenido en la muestra del mucílago de cacao, sirve como alimento para los microorganismos que actúan durante el proceso fermentativo; estimula el crecimiento y la reproducción de la levadura *S. Cerevisiae* creando la ruta metabólica que permite transformar la glucosa y avanzando con la fermentación en alcohol y dióxido de carbono. A lo largo del proceso fermentativo la cantidad de sustrato contenido en la muestra disminuye notablemente conforme avanza la reacción para la obtención de alcohol.



Universidad de Cuenca

Los datos presentados de sustrato en este análisis, se obtuvieron en base a la concentración inicial planteada de °Brix, es decir 8,5; 17; 21 y 24°Brix, en donde se tomó muestra antes de inocular, al inocular, al terminar la fase de latencia y al terminar la fase de crecimiento celular. La cuantificación del sustrato se realizó mediante el método de fenol ácido-sulfúrico y una curva de calibración elaborada por (Guncay Buestán & Silva Ibarra, 2018); la lectura de las muestra se realizó en el equipo de espectrofotometría UV- Visible con una longitud de onda de 490nm.

Los resultados obtenidos en el experimento de 8,5; 17; 21 y 24 °Brix, se muestran en la siguiente tabla:

Tabla 10. Datos obtenidos de °Brix y concentración de sustrato en los experimentos

Tiempo (h)	Experimento 8,5°		Experimento 17°		Experimento 21°		Experimento 24°	
	°Brix	Concentración de Sustrato (g/l)	°Brix	Concentración de Sustrato (g/l)	°Brix	Concentración de Sustrato (g/l)	°Brix	Concentración de Sustrato (g/l)
0	8,8	90,09	17	221,38	21	246,68	24	290,85
0	8,8	78,35	16	182,61	20	234,77	22,5	247,31
2	8,2	36,74	15	113,53	19,5	139,63	20,5	177,07
30	3,5	4,04	6	34,18	7	9,64	8,5	12,67
36	3,5	2,34	6	8,16	7	5,06	8,5	6,91

Fuente: Autores

La toma de muestra para los °Brix se realizó al iniciar la experimentación y cada seis horas conforme avanzó la reacción; los valores obtenidos permitieron identificar las fases de crecimiento y finalización de la misma, debido que se obtuvieron tres valores repetitivos con los cuales se asume la etapa final del proceso fermentativo.

La cuantificación de sustrato se realizó al iniciar y finalizar el proceso fermentativo; para la conservación de las muestras es de gran importancia mantenerlas en nitrógeno líquido, evitando que continúe la fermentación y con ello garantizando el análisis.

En la tabla 10 se constata que la concentración de sustrato varía en bajas cantidades entre la muestra sin inocular e inoculada, mientras que al finalizar la



Universidad de Cuenca

reacción la cantidad de sustrato obtenido es mínima, es decir, se ha consumido la mayor cantidad de azúcares disponibles en la muestra del mucílago de cacao CCN – 51.

En los resultados obtenidos se observa que en el experimento diluido (8,5°Brix) el consumo de sustrato se da en menor tiempo debido que la cantidad de azúcar es relativamente baja; en los experimentos concentrados de 21 y 24°Brix, la duración es más prolongada sin embargo la cantidad de sustrato contenido en la muestra provoca inhibición del crecimiento de la biomasa a lo largo del proceso fermentativo.

El experimento de 17°Brix es el punto de partida para el desarrollo de la experimentación debido a que presenta una cantidad óptima de sustrato que permite la adecuada generación de biomasa y facilita mantener las condiciones en el proceso fermentativo. El método fenol ácido- sulfúrico cuantifica la cantidad de glucosa en la muestra. (Ramos et al., 2009)

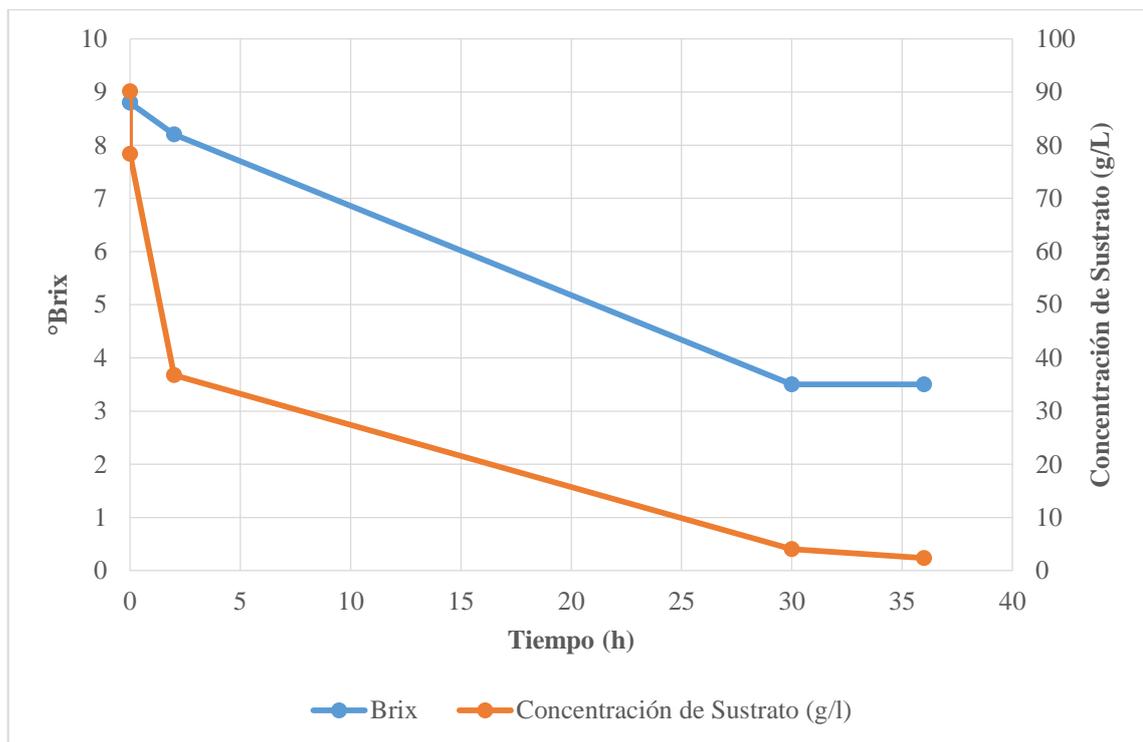


Ilustración 23. Evolución de °Brix y concentración de sustrato en el experimento de 8,5°Brix

En la ilustración 23 se realiza la comparación entre la concentración de sustrato y los °Brix, durante el proceso fermentativo, notando que se inicia el



Universidad de Cuenca

experimento con una concentración de sustrato de 90,09 g/l y 8,8 °Brix; al finalizar la curva se observa que la concentración de sustrato llega a 2,34 g/l y 3,5°Brix, siendo la etapa final de crecimiento a las 30 horas.

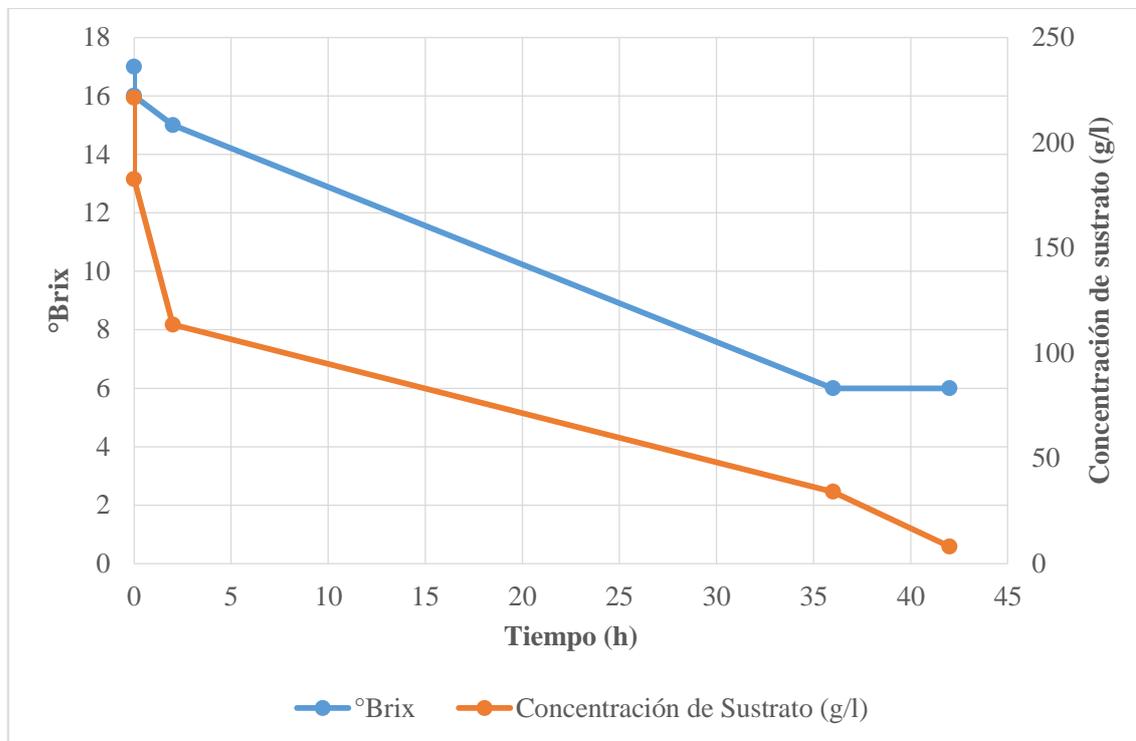


Ilustración 24. Evolución de °Brix y concentración de sustrato en el experimento de 17°Brix

En la ilustración 24 se realiza la comparación entre la concentración de sustrato y los °Brix, durante el proceso fermentativo, notando que se inicia el experimento con una concentración de sustrato de 221,38 g/l y 17 °Brix; al finalizar la curva se observa que la concentración de sustrato llega a 8,16 g/l y 6 °Brix, siendo la etapa final de crecimiento a las 36 horas.

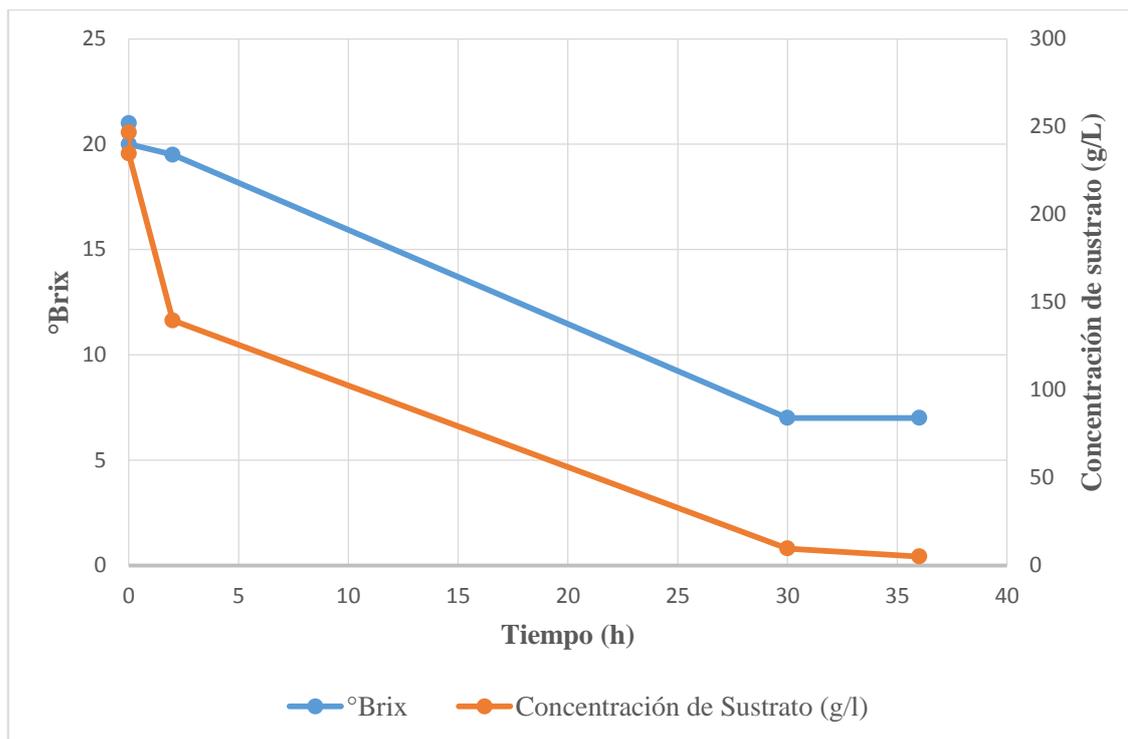


Ilustración 25. Evolución de °Brix y concentración de sustrato en el experimento de 21°Brix

En la ilustración 25 se realiza la comparación entre la concentración de sustrato y los °Brix, durante el proceso fermentativo, notando que se inicia el experimento con una concentración de sustrato de 246,68 g/l y 21 °Brix; al finalizar la curva se observa que la concentración de sustrato llega a 5,06 g/l y 7 °Brix, siendo la etapa final de crecimiento a las 36 horas.

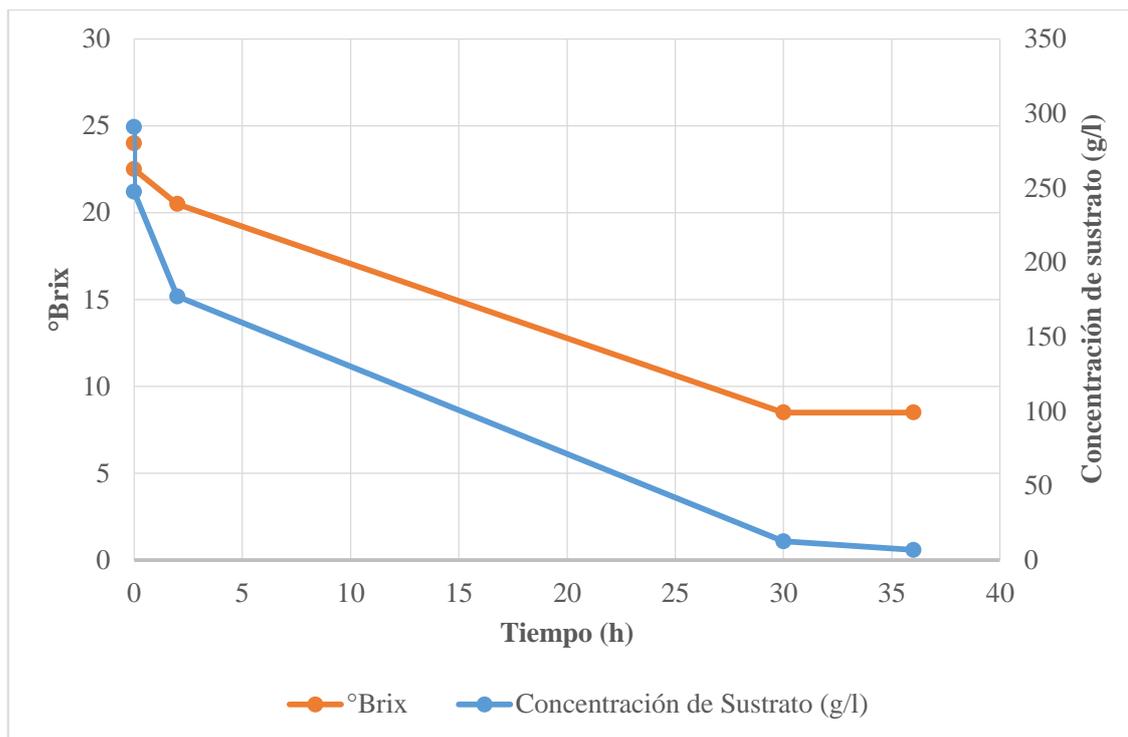


Ilustración 26. Evolución de °Brix y concentración de sustrato en el experimento de 24°Brix

En la ilustración 26 se realiza la comparación entre la concentración de sustrato y los °Brix, durante el proceso fermentativo, notando que se inicia el experimento con una concentración de sustrato de 290,85 g/l y 24 °Brix; al finalizar la curva se observa que la concentración de sustrato llega a 6,90 g/l y 8,5°Brix, siendo la etapa final de crecimiento a las 36 horas.

Como se observa en las gráficas anteriores las tendencias que presentan el consumo de sustrato y °Brix, van disminuyendo a lo largo del proceso fermentativo; iniciando con una concentración alta de sustrato y conforme se desarrolla la reacción ésta disminuye debido que termina la fase exponencial, la disminución de sustrato también se debe al proceso metabólico que desarrollan las levaduras, las cuales toman como fuente de alimento los azúcares de la muestra para llevar a cabo el proceso de glucólisis con la obtención de bioetanol. En el estudio “Evaluación de la producción de etanol utilizando cepas recombinantes de *saccharomyces cerevisiae* a partir de la melaza de caña de azúcar”, (Peña & Arango, 2009) se verifica que el consumo de sustrato disminuye conforme avanza el proceso fermentativo.



Universidad de Cuenca

4.3 Análisis y resultados de la cuantificación de biomasa en el transcurso de la fermentación anaerobia con levadura *S. Cerevisiae*

La biomasa generada durante la experimentación se cuantificó mediante dos métodos: el gravimétrico (Peso Seco) y Liofilización.

La cuantificación de la biomasa por el método directo de peso seco, considera varios elementos como organismos muertos y activos, material inerte, polímeros extracelulares, dando como resultado un dato global y no únicamente la levadura. Es importante recalcar que este método es poco reproducible y requiere de un tiempo prolongado de experimentación. (Arnáiz, Isac, & Lebrat, 2000)

El método de liofilización nos permite cuantificar con mayor exactitud la cantidad de biomasa generada debido a que ayuda a mantener la estructura y aspecto inicial de la muestra; el proceso al llevarse a cabo a temperaturas bajas permite inhibir el deterioro del color por reacciones químicas, permite minimizar la pérdida de constituyentes volátiles de la muestra y reducir el peligro de contaminación microbiana. (Vargas Muñoz, 2015).

Tabla 11. Biomasa inicial y final en los experimentos de 8,5; 17; 21 y 24°Brix por el método de liofilización.

°Brix inicial	Biomasa inicial (g/l)	Biomasa final (g/l)
8,5	1,77	15,5
17	1,77	29,49
21	1,77	34,52
24	1,77	48,46

Fuente: Autores

En la tabla 11 se constata que el valor de biomasa inicial es 1,77 g/l en todos los experimentos, este valor se verificó con la investigación realizada por (Guncay Buestán & Silva Ibarra, 2018) los cuales determinaron el valor de la biomasa sin inocular la muestra con levadura, obteniendo un valor del blanco. Los valores de biomasa final presentados se estimaron a partir de que se obtuvo 3 resultados repetitivos de los °Brix, asimilando que se ha llegado a la etapa final de la fase exponencial, debido a que la reproducción celular finalmente llega a un punto donde se mantiene un equilibrio entre la velocidad



Universidad de Cuenca

de reproducción y la velocidad de muerte celular, manteniendo la concentración de levaduras constante.

El método de peso seco provocó inconvenientes durante la etapa de secado en la estufa; el proceso fermentativo continúa a temperaturas altas (105°C), es por ello que al mantener la muestra en la estufa durante las 72 horas la fermentación continúa y provoca la pérdida de un porcentaje de muestra afectando la cuantificación de biomasa final. Al retirar las muestras de la estufa se observa que el aspecto final es completamente distinto al inicial, se tiene muestras de color café – oscuro y totalmente rígidas. Por otra parte en el método de liofilización la muestra inicial y final conserva en mayor parte el aspecto físico y evita la pérdida de muestra durante el tratamiento de secado.

En la experimentación se visualiza que a mayor °Brix iniciales se inhibe el crecimiento celular debido a que durante el proceso los microorganismos sufren estrés osmótico porque en el medio de reacción existen altas concentraciones de oxígeno disuelto, así la levadura convirtiendo su metabolismo oxidativo a oxi-reductivo o fermentativo disminuyendo la producción de bioetanol, este fenómeno se conoce como el efecto de Crabtree. (Peña & Arango, 2009)

4.4 Análisis y resultados de los métodos por regresión lineal

La regresión lineal es un análisis que nos genera una ecuación que describe la relación entre una o más variables predictoras y la variable respuesta

Los métodos de linealización tienen como datos base la cantidad de sustrato y la velocidad de reacción que se obtiene a partir de la ecuación 2, donde se utiliza la cantidad de biomasa inicial y final en función del tiempo de experimentación.

Tabla 12. Datos obtenidos de consumo de sustrato y velocidad de reacción mediante experimentación

Sustrato (S) [g/l]	Velocidad de reacción [h⁻¹]
90,09	0,079
221,38	0,099
246,67	0,098
290,85	0,105

Fuente: Autores



Universidad de Cuenca

A partir de los datos obtenidos en la tabla 12 cada modelo matemático realiza la manipulación de las variables para obtener las gráficas y consecuentemente los resultados de μ_{max} y K_S

4.4.1 Análisis del método Lineaweaver – Burk

Para la construcción del gráfico las variables a manipular en el eje x es el recíproco del sustrato $\frac{1}{S}$ y en el eje y es el recíproco de la velocidad de reacción $\frac{1}{\mu}$; la velocidad de reacción (u) se calculó mediante la diferencia de la generación de biomasa final e inicial basados en la ecuación número 2.

La obtención de resultados del método gráfico tiene como sustento la experimentación a diferentes concentraciones de °Brix manteniendo constante la cantidad de levadura de 3g/L.

El método de Lineweaver – Burk se basa en recíprocos de la cantidad de sustrato y de la velocidad de reacción cuantificadas previamente, permitiendo construir la gráfica linealizada y así obteniendo los valores de la pendiente e intercepto

Tabla 13. Datos obtenidos para la gráfica de Lineweaver - Burk

	Abscisa	Ordenada
°Brix	1/S	1/u
8,5	12,67	0,011
17	10,013	0,0045
21	10,24	0,0040
24	9,49	0,0034

Fuente: Autores

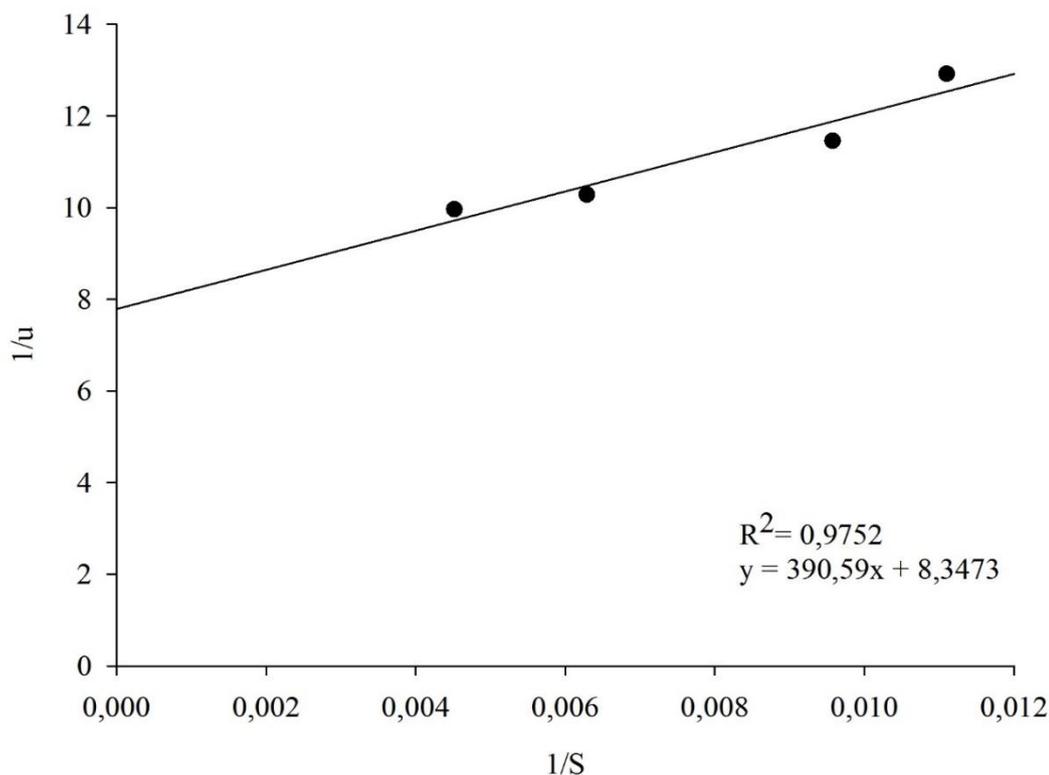


Ilustración 27. Gráfica del modelo Lineweaver - Burk

La gráfica presenta un coeficiente de correlación de $R^2 = 0,9752$ cuyo valor se lo considera aceptable por ser $>0,9$ y una ecuación $y = 390,59x + 8,3473$, que se relaciona a una línea recta y representa los componente de la ecuación de Lineweaver – Burk. La pendiente de la recta es positiva, tanto los valores de x – y van disminuyendo prudencialmente.

Reemplazando los datos obtenidos en la ecuación de la gráfica del intercepto y pendiente, en la ecuación de Lineaweaver – Burk permitió encontrar los valores de K_S y μ_{max} que son presentados en la siguiente tabla.

Tabla 14. Datos obtenidos μ_{max} y K_S obtenidos por el modelo de Lineweaver - Burk

μ_{max} (h^{-1})	K_S (g/l)
0,119	46,79

Fuente: Autores

4.4.2 Análisis del método Eadie Hofstee

El método de Eadie Hofstee permite la construcción de la gráfica tomando como datos para la abscisa $\frac{\mu}{S}$ y en la ordenada μ .



Universidad de Cuenca

En la siguiente tabla se presenta los resultados obtenidos en la experimentación, variando la concentración inicial de °Brix y manteniendo constante la cantidad de levadura.

Tabla 15. Datos obtenidos para la gráfica de Eadie Hofstee

	Abscisa	Ordenada
°Brix	u/s	u
8,5	0,00088	0,079
17	0,00045	0,099
21	0,00039	0,098
24	0,00036	0,105

Fuente: Autores

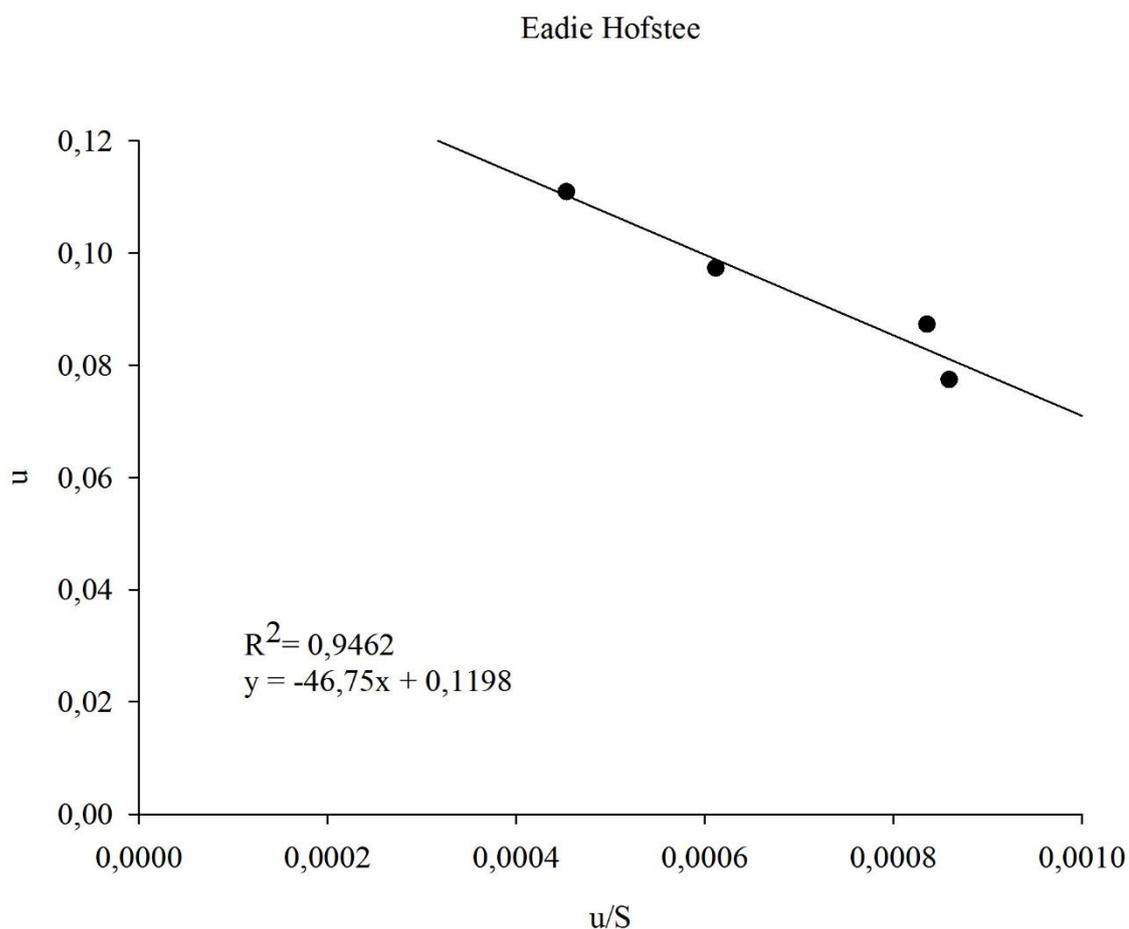


Ilustración 28. Gráfica del modelo de Eadie Hofstee

La gráfica presenta un coeficiente de correlación de $R^2 = 0,9462$ cuyo valor se lo considera aceptable por ser $< 0,9$ y una ecuación $y = -46,75x + 0,1198$, que se relaciona a una línea recta y representa los componente de la ecuación de



Universidad de Cuenca

Eadie Hofstee. La pendiente de la recta es negativa, por lo tanto al disminuir los valores de x aumentan los de y .

Reemplazando los datos obtenidos en la ecuación de la gráfica del intercepto y pendiente, en la ecuación de Eadie Hofstee $\mu = \mu_{max} - \frac{\mu}{S} * K_S$ permitió encontrar los valores de K_S y μ_{max} que son presentados en la siguiente tabla.

Tabla 16. Datos obtenidos de μ_{max} y K_S por el modelo de Eadie Hofstee

μ_{max} (h^{-1})	K_S (g/l)
0,1198	46,75

Fuente: Autores

4.4.3 Análisis del método Hanes Woolf

Para la construcción del gráfico las variables a manipular en el eje x es S (sustrato) y en el eje y es $\frac{S}{\mu}$; la velocidad de reacción (u) se calculó mediante la diferencia de la generación de biomasa final e inicial.

La obtención de resultados del método gráfico tiene como sustento la experimentación a diferentes concentraciones de °Brix manteniendo constante la cantidad de levadura de 3g/L.

Tabla 17. Datos obtenidos para la gráfica del modelo de Hanes Woolf

°Brix	S	S/u
8,5	90,09	1141,63
17	221,38	2216,58
21	246,68	2526,86
24	290,85	2759,55

Fuente: Autores



Hanes Woolf

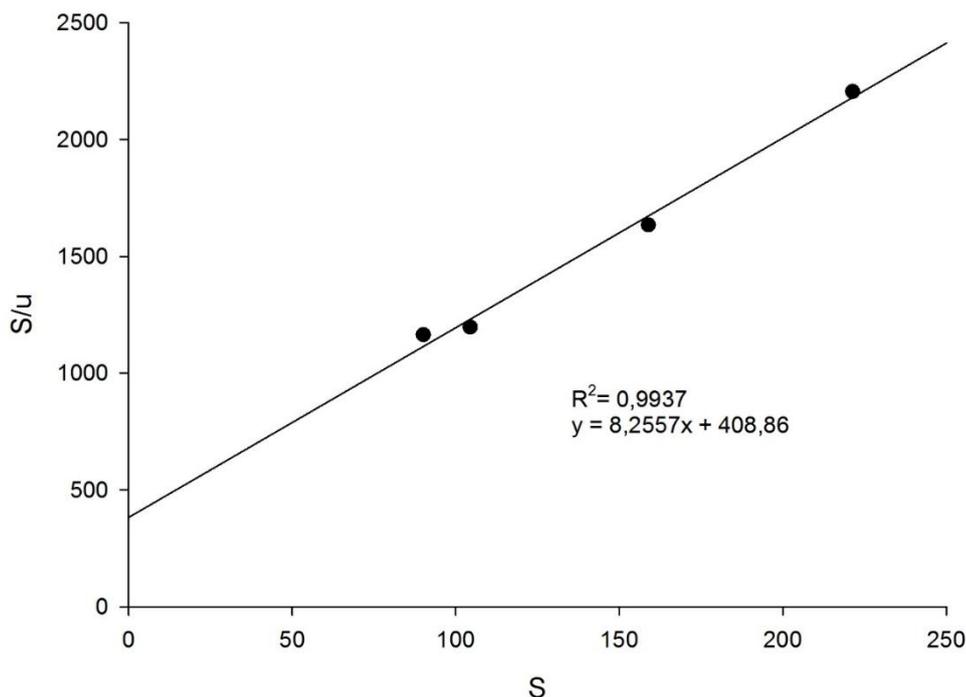


Ilustración 29. Gráfica del modelo de Hanes Woolf

La gráfica presenta un coeficiente de correlación de $R^2 = 0,9937$ cuyo valor se lo considera aceptable por ser $>0,9$ y una ecuación $y = 8,2557x + 408,86$, que se relaciona a una línea recta y representa los componente de la ecuación de Hanes Woolf. La pendiente de la recta es positiva, tanto los valores de $x - y$ van incrementando prudencialmente.

Reemplazando los datos obtenidos en la ecuación de la gráfica del intercepto y pendiente, en la ecuación de Hanes Woolf permitió encontrar los valores de K_S y μ_{max} que son presentados en la siguiente tabla.

Tabla 18. Datos obtenidos de u_{max} y K_S por el modelo de Hanes Woolf

μ_{max} (h^{-1})	K_S (g/l)
0,121	49,53

Fuente: Autores

4.5 Discusión de los modelos matemáticos

Los resultados obtenidos con la aplicación de los modelos matemáticos aplicados en la presente investigación, nos permiten encontrar los parámetros de la ecuación de Monod establecidos en los objetivos; cada modelo lineal me



Universidad de Cuenca

proporciona estimaciones razonables de μ_{max} y K_S que se presentan en la siguiente tabla resumen:

Tabla 19. Resumen de μ_{max} , K_S y R^2 obtenido en los diferentes modelos de linealización

Modelo	μ_{max} (h^{-1})	K_S (g/l)	R^2
Lineweaver – Burk	0,1197	46,792	0,9752
Eadie Hofstee	0,1198	46,75	0,9462
Hanes Woolf	0,121	49,525	0,9937
Fuente: Autores			

Las transformaciones lineales no proporcionan la misma precisión y estimación de los parámetros cinéticos debido a que se manipulan de diferente manera sus variables para la construcción gráfica, dando distinto coeficiente de correlación.

Los errores en la determinación de la velocidad de reacción y la constante de Monod a bajas concentraciones de sustrato se extienden notablemente en el método de Lineweaver – Burk y Eadie Hofstee y en menor proporción en el método de Hanes Woolf. (Lira Silva & Jasso Chávez, 2013)

La concentración de sustrato puede ser controlada fácilmente por el investigador con bastante precisión, mientras que la velocidad de reacción está sujeta a un error más o menos experimental; en función de estos parámetros los métodos lineales ya no proporcionan la misma precisión y estimación de los parámetros. (DOWD & RIGGS, 1965)

Los datos obtenidos en el estudio realizado, a pesar que presentan diferencias de correlación lineal en los diferentes modelos aplicados, R^2 se encuentra dentro de parámetros mayores a 0,9 que de acuerdo a literaturas están dentro de los rangos permitidos para este tipo de fermentaciones. En la investigación (Ariyajaroenwong et al., 2016) se obtiene un $R^2=0,9872$ para los modelos matemáticos, permitiéndonos comprobar la utilidad de los modelos, constantes o parámetros cinéticos aplicados en esta investigación.

Las diferencias que se presentan entre los valores de K_S pueden depender de factores como los tipos y la concentración de sustratos, concentraciones de levadura y cepas o los procesos de fermentación que afectan a los mecanismos de crecimiento. (Ariyajaroenwong et al., 2016)



Tabla 20. Resultados de μ_{max} y K_S

μ_{max} prom (h^{-1})	K_S prom (g/l)
0,1202	47,689

Fuente: Autores

Los valores presentados en la tabla 20, son los promedios obtenidos entre los tres métodos de linealización aplicados en la investigación, dando como resultado final un valor de $\mu_{max} = 0,1202h^{-1}$ que se encuentra en el rango de $(0,1197 - 0,121 h^{-1})$ y $K_S = 47,689 g/l$ estando en un rango de $(46,792 - 49,525g/l)$

Los datos obtenidos son comparados con literatura tomada de (Ariyajaroenwong et al., 2016) en la mencionada investigación la fermentación a partir de jugo de sorgo dulce obtenemos un $K_S = 47,51g/l$, valor que se encuentra dentro del rango obtenido en la presente investigación y dando un porcentaje error de 0,37% en función de la bibliografía consultada. El valor obtenido de μ_{max} difiere del obtenido en la literatura mencionada, debido a que la materia prima utilizada para la fermentación en dicha investigación corresponde al sorgo dulce de caña de azúcar y no tiene la misma composición en el caso de los azúcares fermentables como en el caso del mucílago de cacao aplicado en la presente investigación, más sin embargo el tipo de microorganismo aplicado para el proceso fermentativo es *Saccharomyces Cerevisiae*, en las dos investigaciones de esta manera permitiendo realizar la comparación de los parámetros de la ecuación de Monod.

Los valores de K_S y μ_{max} difieren en gran cantidad en los procesos fermentativos ya que se encuentran en función de factores como los tipos y concentración de sustrato, las concentraciones de levadura, las cepas y las condiciones que se aplican durante el proceso fermentativo.

Uno de los factores más importantes ligados a la fermentación es la concentración de sustrato disponible para la fermentación, este dato se verifica en la investigación realizada por (Garzón Castaño & Hernández Londoño, 2009) donde menciona que la concentración de azúcar óptimo para la fermentación es de 10 -18% puesto que ha concentraciones del 22% las levaduras empiezan a tener problemas en su proceso de respiración celular. La



Universidad de Cuenca

aplicabilidad de los modelos estudiados se dan óptimamente entre concentraciones de azúcar inicial de (130-260 g/l). (Peña & Arango, 2009)

La fase de adaptación del microorganismo al medio de cultivo es una etapa de mucha importancia conocida como latencia, en este punto el microorganismo se adapta al medio para empezar a tomar el alimento y comenzar su proceso metabólico de crecimiento, razón por la cual es de gran importancia que el medio mantenga la homogeneidad en todos los puntos del reactor para que exista la disponibilidad adecuada de nutrientes durante toda la fase de crecimiento y exista una generación óptima de biomasa.

La cinética de una reacción fermentativa es un paso clave en el estudio del avance de la reacción de generación de biomasa; al conocer el valor de la tasa máxima del crecimiento específico (μ_{max}), se conoce el potencial de los microorganismos para la reproducción bajo condiciones óptimas de nutrientes, en la presente investigación alcanza una tasa máxima de crecimiento media en comparación con resultados obtenidos en la investigación de (Ariyajaroenwong et al., 2016). La constante de Monod (K_S) nos permite tener la concepción de la concentración de sustrato a la cual, la tasa de crecimiento de los microorganismos es la mitad de la tasa máxima de crecimiento; esta constante está relacionada al proceso de transporte de sustrato por medio de la membrana celular que se basa en propiedades de la misma y condiciones intracelulares así como también los tipos de proteína transportadora y propiedades de sustrato; por lo tanto K_S , puede definirse como un reflejo de la afinidad de las células respecto al sustrato. (Lerkkasemsan & Lee, 2018)

La ecuación de Monod nos permite relacionar el crecimiento y la utilización del sustrato de forma lineal para este modo relacionar la tasa específica de crecimiento (μ_{max}) de biomasa con el consumo de sustrato.



CAPÍTULO 5: CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

Las condiciones de trabajo se adaptaron a las necesidades adquiridas de la investigación, generando experimentos concentrados y diluidos, que permitieron obtener los resultados de las variables para el estudio propuesto y establecer los parámetros de ajuste apropiados en el bioreactor para garantizar el proceso fermentativo.

Se identificó que la experimentación se realiza de manera más apropiada diluyendo la muestra de mucílago, debido a que la levaduras metabolizan los azúcares fermentables hasta concentraciones máximas de 24°Brix; trabajar con diluidos permite que la muestra se homogenice óptimamente en el reactor Bioreactor Biotron GX Single Vessel y proporcione el ambiente favorable para el crecimiento de los microorganismos y consiga el normal desarrollo de la reacción.

La cuantificación de biomasa se realizó mediante los métodos gravimétricos de peso seco y liofilización, comprobando que el método de peso seco provoca mayor pérdida de muestra en comparación con el método de liofilización que permite eliminar la mayor cantidad de humedad, conserva las propiedades y evita la contaminación de la muestra en análisis.

Se comprobó la generación de biomasa en el transcurso del proceso fermentativo, en donde se obtuvo un dato inicial al que se le denomina blanco y el valor final de cada experimento que varía en función de la concentración de °Brix inicial; el crecimiento de la biomasa va a depender de las condiciones del medio para el desarrollo de los microorganismos.

El consumo del sustrato durante el proceso fermentativo se cuantificó para cada uno de los experimentos que se realizaron a las concentraciones propuestas (8,5; 17; 21; 24, °Brix) a través del método Fenol - ácido sulfúrico (Método de DuBois), en cada uno de los experimentos se observa que la concentración inicial de sustrato es distinta, siendo mayor en la etapa inicial, y a medida que avanza el proceso fermentativo disminuye paulatinamente y por último comienza a mantenerse constante dando por terminado el proceso fermentativo.



Universidad de Cuenca

Los modelos matemáticos aplicados para el estudio cinético del proceso fermentativo del mucílago de cacao CCN – 51, tienen como base para la construcción de sus gráficas las variables de la velocidad de reacción (μ) y la cantidad de sustrato (S); las mismas son manipuladas en función de la exigencia de los modelos cinético.

Mediante los modelos de Lineweaver – Burk y Hanes Woolf los datos de biomasa y de consumo de sustrato pueden ajustarse a una precisión muy alta con un R^2 superior a 0,9; por consiguiente dichos modelos cinéticos guían de manera óptima el comportamiento de la reacción fermentativa.

Se comprobó que el modelo de Hanes Woolf ajusta de mejor manera los datos experimentales del proceso fermentativo obteniendo un R^2 de 0,9937; de acuerdo a la revisión bibliográfica permite corregir errores que se dan en el modelo lineal de Lineweaver – Burk debido a que en el mismo se usa recíprocos que incrementan el porcentaje de error.

Los valores de K_S y μ_{max} se obtuvieron por cada método cinético aplicado en la investigación, a partir de eso se realizó un promedio de datos de la constante de crecimiento y velocidad máxima de reacción alcanzando valores de 47,6889 (g/l) y 0,1202 (h^{-1}) respectivamente; los datos obtenidos se compararon con la bibliografía de (Ariyajaroenwong et al., 2016) que realiza un estudio de modelación cinética lineal de un proceso fermentativo con sorgo de caña utilizando levadura *Saccharomyces Cerevisiae*, estos resultados se contrastaron y se verificó que la constante de crecimiento tiene valores similares, sin embargo en la presente investigación la velocidad máxima de reacción fue menor, debido a que el medio de cultivo utilizado es el mucílago de cacao CCN-51 y se trabajó en diferentes condiciones de ajuste en el reactor.

Los valores de K_S y μ_{max} obtenidos por experimentación a través de los diferentes modelos lineales, permiten una visualización más real de los parámetros en análisis debido a que toma en cuenta factores que afectan el proceso fermentativo como: pH, temperatura, disponibilidad de oxígeno y también la cantidad de sustrato que juega un papel crucial en la fermentación del mucílago de cacao CCN – 51 y en análisis de resultados.



Universidad de Cuenca

Los datos obtenidos de K_S y μ_{max} en la presente investigación se compararon con los valores obtenidos por (Guncay Buestán & Silva Ibarra, 2018), concluyendo que los obtenidos por Matlab difieren en comparación a los alcanzados en la presente investigación; comprobando que experimentalmente se toman en cuenta variables y condiciones reales del proceso fermentativo modificando la cantidad inicial de °Brix, variable que no se tomó en cuenta en la investigación anterior, por otra parte en la investigación (Ariyajaroenwong et al., 2016) se encontró que el valor de $K_S = 1,86$ g/l obtenido por Wöhrer debido a que trabajan con levadura modificada genéticamente; sin embargo en el presente trabajo investigativo no se aplica ese tipo de microorganismo lo que conlleva a la obtención de un dato más certero en relación con las condiciones de trabajo, tipo de microorganismos y medio de cultivo aplicado en el proceso fermentativo de estudio.

RECOMENDACIONES

Se recomienda trabajar en el bioreactor con medios de cultivo diluidos, ya que facilitará mantener las condiciones de trabajo y un adecuado equilibrio en todos los puntos del reactor.

Se recomienda realizar un estudio que trabaje con cepas modificadas genéticamente para contrarrestar los resultados alcanzados en investigaciones similares tanto de parámetros cinéticos como de conversión y productividad.

Se recomienda aplicar el método de liofilización para la cuantificación de biomasa, ya que da mejores resultados para el análisis.



BIBLIOGRAFÍA

- Acosta Romero, C. (2012). *EVALUACIÓN DE LA FERMENTACIÓN ALCOHÓLICA PARA LA PRODUCCIÓN DE HIDROMIEL*. Bog. Retrieved from <http://www.bdigital.unal.edu.co/9933/1/300060.2012.pdf>
- Aguilar Uscanga, M. G., Strehaiano, P., Delia, M. L., & Escudero, B. (2015). *INFLUENCIA DE LA CONCENTRACIÓN INICIAL DE GLUCOSA EN LA PRODUCCION DE ETANOL Y BIOMASA DE *Brettanomyces bruxellensis**. Veracruz-Mexico. Retrieved from https://smbb.mx/congresos/smbb/veracruz01/TRABAJOS/AREA_II/OII-14.pdf
- Alvarado Uriña, C. A., Morales Intriago, F. L., Carrillo Zenteno, M. D., Suarez Zambrano, A. Y., & Briones Caicedo, W. R. (2016). Comparación económica de un sistema de plantación de cacao semitecnificado en dos zonas productoras del Ecuador. *Journal of Science and Research*, 1, 13–16. Retrieved from <http://repositorio.iniap.gob.ec/bitstream/41000/4188/2/iniapeetpAR2016.pdf>
- Anecacao. (2015). CacaoCCN51 | Anecacao Ecuador. Retrieved December 14, 2018, from <http://www.anecacao.com/es/quienes-somos/cacaoccn51.html>
- Arana, I., Orruño, M., & Barcina, I. (2014). *Aspectos Basicos de la Microbiología*. Colombia. Retrieved from https://ocw.ehu.eus/file.php/48/Tema_3._calculo_de_biomasa.pdf
- Ariyajaroenwong, P., Laopaiboon, P., Salakkam, A., Srinophakun, P., & Laopaiboon, L. (2016). Kinetic models for batch and continuous ethanol fermentation from sweet sorghum juice by yeast immobilized on sweet sorghum stalks. *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers*, 66, 210–216. <https://doi.org/10.1016/j.jtice.2016.06.023>
- Arnáiz, C., Isac, L., & Lebrat, J. (2000). *Determinación de la biomasa en procesos biológicos*. España. Retrieved from http://sgpwe.izt.uam.mx/files/users/uami/tvolke/00_Determin-BM.pdf
- Arnáiz Franco, C., Isac Oria, L., & Lebrato Martínez, J. (2000). *Tecnología del agua*. Prensa XXI. Retrieved from <https://idus.us.es/xmlui/handle/11441/34261>
- Arteaga Estrella, Y. (2013). *Estudio del desperdicio del mucílago de cacao en el cantón Naranjal (Provincia del Guayas)*. *ECA Sinergia* (Vol. 4). Universidad Técnica de Manabí. Retrieved from <https://revistas.utm.edu.ec/index.php/ECASinergia/article/view/149>
- Atlas bioenergético del Ecuador*. (2014). INP. Retrieved from <http://biblioteca.olade.org/cgi-bin/koha/opac-detail.pl?biblionumber=5720>
- Bai, F. W., Anderson, W. A., & Moo-Young, M. (2007). Ethanol fermentation technologies from sugar and starch feedstocks. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2007.09.002>
- Barrera, R. N., & Reyes Muro, J. L. (2015). *“OPTIMIZACIÓN DE LOS PARÁMETROS DEL PROCESO DE FERMENTACIÓN DEL JUGO DE CAÑA PARA OBTENER BIOETANOL EN LA PLANTA PILOTO DE*



Universidad de Cuenca

- ALCOHOL DE LA FACULTAD DE INGENIERÍA QUÍMICA-UNAP.* Universidad Nacional de la Amazonía Peruana. Retrieved from http://repositorio.unapikitos.edu.pe/bitstream/handle/UNAP/4160/Richar_Tesis_Titulo_2016.pdf?sequence=1&isAllowed=y
- Blanco Paz, A. J. (2016). *Modelamiento cinético de la fermentación alcohólica de miel de abejas a diferentes escalas de producción*. Bogota, Colombia. Retrieved from <http://bdigital.unal.edu.co/56557/1/1026562340.2017.pdf>
- Campos-Vega, R., Nieto-Figueroa, K. H., & Oomah, B. D. (2018). Cocoa (*Theobroma cacao* L.) pod husk: Renewable source of bioactive compounds. *Trends in Food Science & Technology*, 81, 172–184. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2018.09.022>
- Capelo Armijos, M. J., & Pérez Ulloa, M. E. (2011). Determinación de carbohidratos totales en bebidas analcohólicas consumidas por adolescentes en la ciudad de Cuenca y Nabón. Retrieved from <http://dspace.ucuenca.edu.ec/handle/123456789/2452>
- Cardozo Guzmán, C. M., & Moreno Cardozo, J. H. (2012). *DISEÑO Y OPTIMIZACIÓN DE UN MEDIO DE CULTIVO A BASE DE MELAZA DE CAÑA PARA LA PRODUCCIÓN DE BIOMASA A PARTIR DE Saccharomyces cerevisiae*. Bogota, Colombia. Retrieved from <https://repository.javeriana.edu.co/bitstream/handle/10554/11788/CardozoGuzmanMariaCamila2012.pdf?sequence=1>
- CFN. (2018). FICHA SECTORIAL: Cacao y Chocolate. Retrieved December 14, 2018, from <https://www.cfn.fin.ec/wp-content/uploads/2018/04/Ficha-Sectorial-Cacao.pdf>
- Dostert, N., Roque, J., Cano, A., La Torre, M. I., & Weigend, Ma. (2011). *Hoja botánica: Cacao*. Retrieved from http://www.botconsult.com/downloads/Hoja_Botanica_Cacao_2012.pdf
- DOWD, J. E., & RIGGS, D. S. (1965). A COMPARISON OF ESTIMATES OF MICHAELIS-MENTEN KINETIC CONSTANTS FROM VARIOUS LINEAR TRANSFORMATIONS. *The Journal of Biological Chemistry*, 240, 863–9. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14275146>
- Dútan Mora, E. (2014). *MODELACIÓN CINÉTICA DE LA FERMENTACIÓN ALCOHÓLICA DEL ZUMO DE POMARROSA*. Quito. Retrieved from <http://www.dspace.uce.edu.ec/bitstream/25000/2308/1/T-UC-0017-64.pdf>
- Eduardo, C., & Alzate, O. (n.d.). *CONGELACIÓN Y LIOFILIZACIÓN DE ALIMENTOS*. Retrieved from <http://www.bdigital.unal.edu.co/7837/1/9789584444363.pdf>
- Fajardo Garces. (2013). cacao_ccn51. Retrieved December 14, 2018, from http://www.elcacaotero.com.ec/cacao_ccn51.html
- Garzón Castaño, S. C., & Hernández Londoño, C. (2009). *Estudio comparativo para la producción de etanol entre saccharomyces Cerevisiae Silvestre, Saccharomyces Cerevisiae ATCC 9763 y Candida Utilis ATCC 9950*. Pereira : Universidad Tecnológica de Pereira.



Universidad de Cuenca

- Ge, X. M., & Bai, F. W. (2006). Intrinsic kinetics of continuous growth and ethanol production of a flocculating fusant yeast strain SPSC01. *Journal of Biotechnology*, 124, 363–372. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2005.12.029>
- Gómez, C. C., & Samara, P. M. (2014). *Libro Blanco del Azúcar*. (EDIMSA, Ed.). Madrid: Instituto de estudios del Azucar y la Remolacha. Retrieved from <http://www.madrid.org/cs/Satellite?blobcol=urldata&blobheader=application%2Fpdf&blobheadername1=Content-disposition&blobheadername2=cadena&blobheadervalue1=filename%3DLibro-Blanco-del-Azucar-Indice-Interactivo.pdf&blobheadervalue2=language%3Des%26site%3DH>
- Gracia Carvajal, T. D., & Mateo Coello, G. F. (2016). *APROVECHAMIENTO DEL BAGAZO INDUSTRIAL DE CAFÉ COMO BIOMASA PARA LA SUSTITUCIÓN PARCIAL DE COMBUSTIBLE*. UNIVERSIDAD DE GUAYAQUIL. Retrieved from <http://repositorio.ug.edu.ec/bitstream/redug/18101/1/401-1209> - Aprovechamiento del bagazo industrial de cafe como biomasa.pdf
- Guncay Buestán, J. V., & Silva Ibarra, M. V. (2018). Optimización de la producción de biomasa en procesos fermentativos del mucílago de cacao CCN – 51 aplicando la ecuación logística integrada y el modelo de Andrew y Levenspiel, bajo diferentes condiciones de operación. Retrieved from <http://dspace.ucuenca.edu.ec/handle/123456789/30426>
- Harris, D. C., & Berenguer Navarro, V. (2007). *Análisis químico cuantitativo*. Reverté.
- Kang, A., & Lee, T. S. (2015). Converting Sugars to Biofuels: Ethanol and Beyond. *Bioengineering*, 2(4), 184–203. <https://doi.org/10.3390/bioengineering2040184>
- Kumar, S. (2006). Spectroscopy of Organic Compounds. Retrieved December 13, 2018, from http://www.uobabylon.edu.iq/eprints/publication_11_8282_250.pdf
- Lerkkasemsan, N., & Lee, W.-C. (2018). Study of ethanol fermentation reaction using *Saccharomyces diastaticus* in a two-tank fermentation system with cell recycling. *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers*, 91, 86–96. <https://doi.org/10.1016/j.jtice.2018.06.001>
- Levapan. (2018). Levapan. Retrieved January 8, 2019, from <http://www.levapan.com.ec/portfolio-item/levadura-fresca-levapan/>
- Lira Silva, E., & Jasso Chávez, R. (2013). *COMPARACIÓN DE LOS DIFERENTES MÉTODOS DE ANÁLISIS CINÉTICOS PARA DETERMINAR EL TIPO DE INHIBICIÓN DE DOS COMPUESTOS**. *REB* (Vol. 32).
- Lodeiro, A. R. (2015). *Catálisis enzimática Fundamentos químicos de la vida*. Argentina: Editorial de la Universidad de la Plata.
- López-Pérez, P. A., Cuervo-Parra, J. A., Robles-Olvera, V. J., Del C Rodriguez Jimenes, G., Pérez España, V. H., & Romero-Cortes, T. (2018).



Universidad de Cuenca

- Development of a Novel Kinetic Model for Cocoa Fermentation Applying the Evolutionary Optimization Approach. *International Journal of Food Engineering*, 14(5–6). <https://doi.org/10.1515/ijfe-2017-0206>
- López Legarda, X., Taramuel Gallardo, A., Segura Sánchez, F., & Restrepo Bentacur, L. F. (2017). Revista cubana de química. *Revista Cubana de Química*, 29(2), 180–198. Retrieved from http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2224-54212017000200002
- Millán, F. (2016). Libro de Espectroscopía UV Visible. Retrieved December 14, 2018, from https://www.researchgate.net/publication/306350453_Libro_de_Espectroscopia_UV_Visible
- Nieto Galarza, H. O. (2009). *Evaluación de las condiciones de la fermentación alcohólica utilizando Saccharomyces cerevisiae y jugo de caña de azúcar como sustrato para obtener etanol. Previa*. Quito-Ecuador. Retrieved from <https://repositorio.espe.edu.ec/bitstream/21000/990/1/T-ESPE-026782.pdf>
- Nolivos Campoverde, M. K. (2017). “*MODELACION CINÉTICA DE LA FERMENTACIÓN ALCOHÓLICA A PARTIR DE BEBIDAS GASEOSAS CADUCADAS*.” Quito. Retrieved from <http://www.dspace.uce.edu.ec/bitstream/25000/10873/1/T-UCE-0017-0016-2017.pdf>
- Oliveira Nunes, C. da S., Mafrá de Carvalho, G. B., Cardoso da Silva, M. L., da Silva, G. P., Souza Machado, B. A., & Trovatti Uetanabaro, A. P. (2017). Cocoa pulp in beer production: Applicability and fermentative process performance. *PLOS ONE*, 12(4), 21. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0175677>
- Patricia Durango Londoño, L., Villegas Escobar, V., & Carvajal, F. O. (2007). *Evaluación y escalamiento de la producción de levaduras nativas tipo Saccharomyces spp. A nivel de laboratorio*. Retrieved from https://repository.eafit.edu.co/bitstream/handle/10784/399/LauraPatricia_DurangoLondo%F1o_2007.pdf;jsessionid=6FC216A0371F6CC05619BE47E93B2F79?sequence=1
- Paz Blanco, J. A. (2016). *Modelamiento cinético de la fermentación alcohólica de miel de abejas a diferentes escalas de producción*. Retrieved from <http://bdigital.unal.edu.co/56557/1/1026562340.2017.pdf>
- Peña, C., & Arango, R. (2009). EVALUATION OF ETHANOL PRODUCTION USING RECOMBINANT STRAINS OF *Saccharomyces cerevisiae* FROM SUGAR CANE MOLASSES. *Año*, 76, 153–161. Retrieved from <http://www.scielo.org.co/pdf/dyna/v76n159/a16v76n159.pdf>
- Quizhpi Nieves, E. X. (2016). Caracterización del mucilago de cacao CCN 51 mediante espectrofotometría UV-visible y absorción atómica” caso: Ecuador-zona 6. Retrieved from <http://dspace.ucuenca.edu.ec/handle/123456789/25266>
- Ramos, R., Ae, A., Ccopa, E., Ae, R., Ae, D. I. P. A., Maciel, R., ... Costa, A. C.



Universidad de Cuenca

- (2009). Study of kinetic parameters in a mechanistic model for bioethanol production through a screening technique and optimization. <https://doi.org/10.1007/s00449-008-0291-8>
- SanCarlos. (2018). SanCarlos. Retrieved January 15, 2019, from <http://www.sancarlos.com.ec/portal/es/web/ingeniosancarlos/productos>
- Scheiblauber, J., Scheiner, S., Joksch, M., & Kavsek, B. (2018). Fermentation of *Saccharomyces cerevisiae* – Combining kinetic modeling and optimization techniques points out avenues to effective process design. *Journal of Theoretical Biology*, 453, 125–135. <https://doi.org/10.1016/J.JTBI.2018.05.016>
- Serpa Nieves, A. C., & Tenesaca Castillo, O. V. (2018). Influencia en la producción de biomasa, etanol y ácido acético con el incremento de la concentración de la levadura *Saccharomyces Cerevisiae* en fermentaciones anaerobias del mucílago del cacao CCN-51. Retrieved from <http://dspace.ucuenca.edu.ec/handle/123456789/30970>
- Trinidad Bello, A. (2014). *MODELOS DE CRECIMIENTO EN BIOLOGÍA, SU SIGNIFICADO BIOLÓGICO Y SELECCIÓN DEL MODELO POR SU AJUSTE*. Mexico. Retrieved from http://mat.izt.uam.mx/mcmai/documentos/tesis/Gen.11-O/Adalberto_Trinidad.pdf
- Universidad Politecnica de Valencia. (2014). Departamento de Quimica Analitica. Retrieved February 20, 2019, from https://www.uv.es/gammmm/SubsitioOperaciones/disoluciones_patron.htm
- Vandna, P., Ravindra, S., Pankaj, G., & Rakesh, P. (2015). Microalgae as Emerging source of Energy: A Review. *Research Journal of Chemical Sciences* _____ ISSN 2231-606X, 5(3), 63–68. Retrieved from www.isca.me
- Vargas Muñoz, D. P. (2015). *Efecto de la liofilización sobre propiedades fisicoquímicas y vida útil de cocona (Solanum sessiliflorum Dunal) en polvo*. Retrieved from http://bdigital.unal.edu.co/48709/1/Diana_Patricia_Vargas_Muñoz.pdf
- Vega Arredondo, B. O., & Voltolina, D. (2007). *Determinación de peso seco y contenido orgánico e inorgánico*. La Paz, Baja California Sur. México. Retrieved from https://www.researchgate.net/publication/281783352_Determinacion_de_peso_seco_y_contenido_organico_e_inorganico
- Zanetti, M. (2012). *CACAO Y CHOCOLATE: DEL NUEVO AL VIEJO MUNDO A TRAVÉS DEL ESPAÑOL*. Retrieved from https://cvc.cervantes.es/ensenanza/biblioteca_ele/aepe/pdf/congreso_47/congreso_47_23.pdf
- Zapata, J. E., Hoyos, M., & Quinchía, L. A. (2005). KINETIC PARAMETERS OF GROWTH OF *Saccharomyces cerevisiae* AFFECTED BY A VARYING MAGNETIC FIELD OF LOW INTENSITY AND HIGH FREQUENCY.



Universidad de Cuenca

Revista de La Facultad de Química Farmacéutica, 12, 39–44. Retrieved from <http://www.scielo.org.co/pdf/vitae/v12n1/v12n1a05.pdf>



ANEXOS

Anexo I. Datos y resultados de sustrato en el experimento a 8,5 °Brix

Experimentos			Absorción (nm)		Concentración de Sustrato (g/L)
Hora	Diluciones	#Muestra	Promedio		
sin levadura 0	1/100	1	0,579		90,0940
	1/25	2	0,556		
		3	0,568		
		4	0,575		
0 con levadura	1/100	1	0,527		78,3459
	1/25	2	0,502		
		3	0,492		
		3	0,284		
2	1/100	1	0,284		36,7419
	1/25	2	0,289		
		3	0,284		
30	1/100	1	0,115		4,0351
	1/25	2	0,111		
		3	0,109		
36	1/100	1	0,114		2,3434
	1/25	2	0,108		
		3	0,086		

Fuente: Autores

Anexo II. Datos y resultados de sustrato en el experimento a 17 °Brix

Experimentos			Absorción (nm)		Concentración de Sustrato (g/L)
Hora	Diluciones	#Muestra	Promedio		
sin levadura 0	1/1000	1	0,279		221,3816
	1/25	2	0,314		
		3	0,338		
0 con levadura	1/1000	1	0,279		182,6128
	1/25	2	0,290		
	3	0,210			
2	1/1000	1	0,210		113,5338
	1/500	2	0,214		
		3	0,209		
6	1/1000	1	0,189		95,9900
	1/250	2	0,191		
		3	0,197		
12	1/250	1	0,208		54,2607
	1/25	2	0,194		
		3	0,215		



Universidad de Cuenca

18	1/500	A	0,139	0,183	43,7657
	1/25	B	0,132		
		C	0,279		
24	1/250	A	0,272	0,236	34,1792
	1/25	B	0,260		
		C	0,175		
30	1/100	A	0,078	0,177	8,1579
	1/25	B	0,177		
		C	0,141		

Fuente: Autores

Anexo III. Datos y resultados de sustrato en el experimento a 21 °Brix

Hora	Experimento		Absorción (nm)		Concentración de Sustrato (g/L)	
	Diluciones	#Muestra	Promedio			
sin levadura 0	1/1000	1	0,348	0,353	246,6792	
	1/25	2	0,346			
		3	0,364			
con levadura 0	1/1000	1	0,289	0,340	234,7744	
	1/25	2	0,391			
		3	0,392			
	2	1/500	1	0,389	0,387	139,6303
		1/25	2	0,382		
			3	0,391		
36	1/100	1	0,156	0,144	5,0564	
	1/25	2	0,147			
		3	0,129			

Fuente: Autores

Anexo IV. Datos y resultados de sustrato en el experimento a 24 °Brix

Hora	Experimento		Absorción (nm)		Concentración Sustrato (g/L)	
	Diluciones	Muestra	Promedio			
sin levadura 0	1/1000	1	0,403	0,400	290,8521	
	1/25	2	0,399			
		3	0,397			
con levadura 0	1/1000	1	0,354	0,353	247,3058	
	1/25	2	0,351			
		3	0,355			
	2	1/500	1	0,471	0,467	177,0677



Universidad de Cuenca

	1/25	2	0,461		
		3	0,469		
	1/100	1	0,224		
30	1/25	2	0,203	0,225	12,6692
		3	0,248		
	1/100	1	0,152		
36	1/25	2	0,192	0,164	6,9048
		3	0,147		

Fuente: Autores

Anexo V. Imágenes de la recolección del cacao CCN – 51 sector Zhucay





Ilustración 30. Fotografía tomada en la finca en el cantón Naranjal

Anexo VI. Imágenes de extracción del mucílago de cacao CCN – 51



Ilustración 31. Fotografía limpieza y lavado de mazorcas de cacao



Ilustración 32. Cortado, desvenado y recolección de pepas de la mazorca de cacao

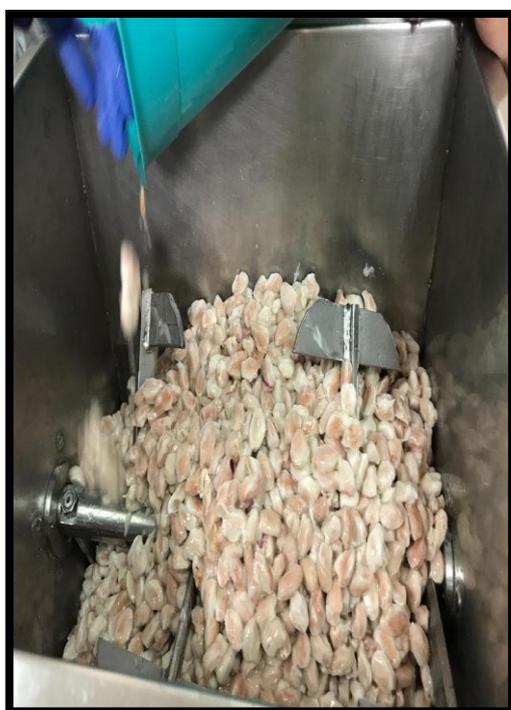


Ilustración 33. Ablandamiento de las pepas de la mazorca de cacao



Ilustración 34. Fluidificación del mucílago de cacao en el laboratorio de alimentos del tecnológico de la Universidad de Cuenca



Ilustración 35. Pasteurización del mucílago de cacao



Ilustración 36. Esterilización de recipientes, envasado y etiquetado del mucílago de cacao



Universidad de Cuenca

Anexo VII. Imágenes de preparación del bioreactor para el proceso fermentativo



Ilustración 37. Ajuste de parámetros del mucílago de cacao para la experimentación



Ilustración 38. Llenado del mucílago en el reactor Batch

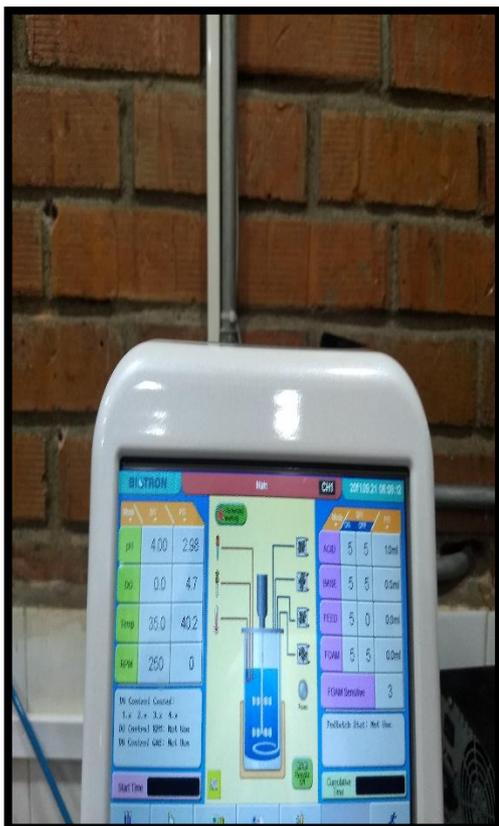


Ilustración 39. Ajuste de parámetros de funcionamiento en el reactor, en el laboratorio de la Ingeniería de la reacción, Tecnológico de la Universidad de Cuenca



Universidad de Cuenca

Anexo VII. Imágenes del método gravimétrico peso seco, para la cuantificación de biomasa



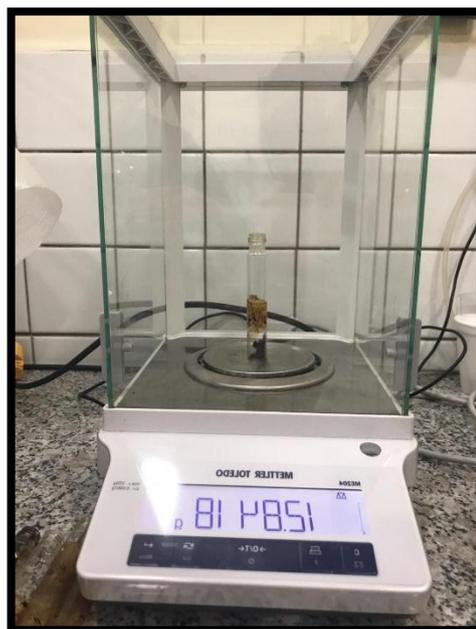


Ilustración 40. Fotografías del proceso para la cuantificación de biomasa por el método de peso seco en el laboratorio de operaciones unitarias, tecnológico de la Universidad de Cuenca

Anexo VIII. Imágenes del método de liofilización, para la cuantificación de biomasa







Ilustración 41. Cuantificación de biomasa por el método de liofilización, laboratorio de humidificación y secado, tecnológico de la Universidad de Cuenca

Anexo IX. Imágenes del método Fenol – ácido sulfúrico, para la cuantificación de sustrato



