



UNIVERSIDAD DE CUENCA
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS
ESCUELA DE INGENIERÍA QUÍMICA

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

Trabajo de Titulación previo a la obtención del
título de Ingeniera/o Química/o

AUTORES:

Jessica Valeria Guncay Buestán C.I 0105625727

Marco Vinicio Silva Ibarra C.I 0106516610

DIRECTOR:

Mg. Jorge Washington Delgado Noboa C.I 0103599411

CUENCA – ECUADOR

Mayo 2018

RESUMEN

El objetivo de este estudio fue optimizar las variables que intervienen en la producción de biomasa a partir del mucílago de cacao CCN – 51 en la fermentación discontinua de etanol con *S. cerevisiae*; y a partir de los resultados óptimos realizar un modelado cinético a través de la ecuación logística integrada y el modelo de Andrew y Levenspiel. Las diferentes condiciones de operación se determinaron mediante diseño factorial completo con dos niveles y tres variables (2^3): temperatura, pH y concentración de levadura. Las fermentaciones se realizaron en un biorreactor de tanque agitado y simultáneamente se llevó a cabo la cuantificación de biomasa mediante el método analítico peso seco; posteriormente se ajustaron los modelos a los datos experimentales, es decir, minimizando la discrepancia entre las predicciones del modelo y los datos experimentales, correspondientes a las condiciones óptimas de operación, empleando el software MATLAB (Versión 8.3). Los resultados obtenidos indicaron que la temperatura, pH y concentración de levadura óptimos de fermentación son 35 °C, 4 y 3 g/L respectivamente. En estas condiciones se obtuvo una concentración final de biomasa de 90,9880 g/L después de 34,5 horas de fermentación. El modelo logístico describió el crecimiento de levadura en función de la concentración inicial de biomasa, el tiempo de fermentación, la tasa de crecimiento específico máximo y la concentración final de biomasa; mientras que el modelo de Andrew y Levenspiel representó la limitación e inhibición del sustrato y la inhibición del etanol. Se encontró que los modelos pudieron ajustar satisfactoriamente los datos experimentales con un coeficiente de determinación muy alto ($R^2 > 0,90$), pudiendo utilizarse para el desarrollo del proceso de producción de biomasa a partir del mucílago de cacao.

Palabras claves: Mucílago, fermentación, biomasa, ecuación logística integrada, modelo de Andrew y Levenspiel.



ABSTRACT

The main objective of this study was: optimize the variables involved in the biomass production process from cocoa mucilage CCN – 51 in batch ethanol fermentation with *S. cerevisiae*; and from optimum results perform kinetic modeling through integrated logistic equation and Andrew and Levenspiel model. The operating conditions were determined by factorial design with two levels and three variables (2^3): temperature, pH and yeast's concentration. Fermentations were performed in a stirred tank bioreactor further biomass was quantified by the method of dry weight. Later models to experimental data were adjusted, minimizing the discrepancy between model predictions and experimental, corresponding to the optimum operating conditions data, using MATLAB (Version 8.3). The results of temperature, pH and optimum concentration of yeast were 35 °C, 4 and 3 g/L respectively, with a final concentration of biomass 90,9880 g/L were obtained after 34,5 hours of fermentation. The logistic model described yeast growth depending on the initial concentration of biomass, fermentation time, the specific growth rate and maximum final biomass concentration; while the Andrew and Levenspiel model represented limitation and substrate inhibition and ethanol inhibition. The results showed that the models satisfactorily fit the experimental data ($R^2 > 0,90$), proving be suitable for process modeling.

Keywords: Mucilage, fermentation, biomass, integrated logistic equation, Andrew and Levenspiel model.

ÍNDICE DE CONTENIDO

RESUMEN	2
ABSTRACT.....	3
ÍNDICE DE FIGURAS	8
ÍNDICE DE TABLAS	13
NOMENCLATURA	16
CLÁUSULAS DE RESPONSABILIDAD	17
DEDICATORIA.....	21
DEDICATORIA.....	22
AGRADECIMIENTOS.....	23
1. INTRODUCCIÓN	24
2. CONTENIDO TEÓRICO.....	26
2.1. CACAO.....	26
2.1.1. Generalidades.....	26
2.1.2. Variedades de Cacao en el Ecuador.....	27
2.1.2.1. Criollo o Nativo.	27
2.1.2.2. Forastero.	28
2.1.2.3. Trinitario.	28
2.1.2.3.1. Cacao CCN – 51.	28
2.1.2.4. Nacional.	29
2.1.3. Producción de cacao en el Ecuador.	29
2.1.4. Mucílago de cacao.	30
2.2. LEVADURAS.....	31
2.2.1. Generalidades.....	31
2.2.2. Características de las levaduras.	32
2.2.3. Composición típica de las levaduras.....	32
2.2.4. Características Fisiológicas.....	32
2.2.4.1. Temperatura.	33
2.2.4.2. pH.....	33

2.2.4.3.	Oxígeno.....	33
2.2.4.4.	Nutrición.....	34
2.2.5.	Principales usos de las levaduras.....	34
2.2.6.	Crecimiento celular.....	35
2.2.7.	<i>Saccharomyces Cerevisiae</i>	37
2.2.7.1.	Composición química.....	39
2.2.7.2.	Nutrición.....	39
2.2.7.3.	Requerimientos físico – químicos.....	40
2.2.7.4.	Inhibidores de crecimiento.....	40
2.2.7.5.	Tolerancia al etanol.....	41
2.3.	FERMENTACIÓN ALCOHÓLICA.....	41
2.3.1.	Condiciones para la fermentación alcohólica.....	42
2.3.1.1.	Temperatura.....	43
2.3.1.2.	pH.....	44
2.3.1.3.	Nutrientes.....	44
2.3.1.4.	Aireación.....	44
2.3.1.5.	Concentración de Sustrato.....	44
2.3.1.6.	Concentración de etanol.....	45
2.3.2.	Sistemas de Fermentación.....	45
2.3.2.1.	Sistema de fermentación discontinuo.....	45
2.3.2.2.	Sistema de fermentación continuo.....	46
2.4.	MODELO DE MONOD.....	46
2.5.	MODELO LOGÍSTICO.....	48
2.5.1.	Ejemplo de crecimiento logístico.....	49
2.6.	MODELO DE GOMPERTZ MODIFICADO.....	50
2.7.	MODELO DE ANDREW Y LEVENSPIEL.....	51
3.	METODOLOGÍA.....	52
3.1.	MATERIA PRIMA.....	52
3.1.1.	Mucílago de cacao CCN – 51.....	52
3.1.2.	Levadura.....	53
3.2.	MATERIALES, EQUIPOS Y REACTIVOS.....	53
3.2.1.	Material de laboratorio y otros.....	53

3.2.2. Equipos.....	54
3.2.3. Reactivos químicos.....	54
3.3. MÉTODOS.....	54
3.3.1. Extracción del mucílago de cacao CCN – 51.....	54
3.3.2. Matriz de diseño experimental.....	56
3.3.2.1. Determinación de los efectos de las variables.....	57
3.3.3. Fermentación discontinua de etanol.....	57
3.3.3.1. Diagrama de Flujo.....	59
3.3.4. Método analítico peso seco.....	59
3.3.4.1. Diagrama de Flujo.....	61
3.3.4.2. Determinación de los parámetros óptimos de operación.....	61
3.3.5. Modelo de Monod.....	62
3.3.6. Modelo logístico.....	62
3.3.7. Modelo de Gompertz modificado.....	62
3.3.8. Modelo de Andrew y Levenspiel.....	63
4. ANÁLISIS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS.....	64
4.1. OPTIMIZACIÓN DE LAS VARIABLES QUE INTERVIENEN EN LA PRODUCCIÓN DE BIOMASA EN PROCESOS FERMENTATIVOS.....	64
4.1.1. Método analítico peso seco.....	64
4.1.1.1. Análisis de los resultados del Experimento 6.....	64
4.1.1.2. Correlación de las variables del diseño experimental.....	68
4.1.1.3. Parámetros óptimos de operación.....	74
4.2. MODELO DE MONOD.....	75
4.3. MODELO LOGÍSTICO.....	76
4.4. MODELO DE GOMPERTZ MODIFICADO.....	79
4.5. MODELO DE ANDREW Y LEVENSPIEL.....	82
5. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....	87
REFERENCIAS.....	90



ANEXOS.....	100
ANEXO 1. RESULTADOS DEL PRE – EXPERIMENTO REALIZADO DURANTE 336 HORAS (14 DÍAS).....	100
ANEXO 2. RESULTADOS DEL MÉTODO ANALÍTICO PESO SECO	102
ANEXO 3. MANUAL DEL BIORREACTOR BIOTRON GX	127
ANEXO 4. FOTOGRAFÍAS DE LA FASE EXPERIMENTAL DEL ESTUDIO	133

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Principales variedades de cacao en el Ecuador.	27
Figura 2. Cacao criollo o nativo maduro.	27
Figura 3. Cacao forastero maduro.....	28
Figura 4. Cacao trinitario maduro.....	28
Figura 5. Cacao CCN – 51 maduro.....	28
Figura 6. Cacao nacional maduro.	29
Figura 7. Exportación total del cacao ecuatoriano y residuo mucilaginoso.	30
Figura 8. Principales usos de las levaduras.....	35
Figura 9. Ciclo de crecimiento de las levaduras.	36
Figura 10. Crecimiento de <i>S. cerevisiae</i> en: a) agar dextrosa saboraud, b) microscopia de contraste de fases x580 aumentos y c) microscopía electrónica de barrido, x7040 aumentos.	38
Figura 11. Transformación de la glucosa a etanol en fermentación alcohólica (vía de Embden – Meyerhof – Parnas).	42
Figura 12. Fase exponencial de crecimiento microbiano.	47
Figura 13. Curva de crecimiento logístico en forma de S de la levadura cultivada en condiciones ideales en un tubo de ensayo.	50
Figura 14. Diagrama de Flujo para la extracción del mucílago de cacao CCN – 51.....	55
Figura 15. Diagrama de Flujo para la fermentación discontinua de etanol.	59
Figura 16. Diagrama de Flujo para el método analítico peso seco.	61
Figura 17. Concentración de biomasa en fermentación discontinua con las condiciones de operación de pH (4), temperatura (35°C) y concentración de levadura (3g/L) aplicando el método analítico de peso seco.....	66
Figura 18. Variación de los grados Brix en fermentación discontinua con las condiciones de operación de pH (4), temperatura (35°C) y concentración de levadura (3g/L).	67
Figura 19. Pareto de efectos estimados para la concentración de biomasa.	70
Figura 20. Pareto para la concentración de biomasa sin considerar algunos efectos	71
Figura 21. Representación de los efectos principales para la concentración de biomasa.	71
Figura 22. Representación de las interacciones dobles para la concentración de biomasa. A: Temperatura (°C). B: pH. C: concentración de levadura (g/L).	72



Figura 23. Gráfico de cubo y respuesta predicha para la concentración de biomasa. ...	73
Figura 24. Concentraciones finales de biomasa y etanol obtenidos durante el proceso de fermentación discontinua. Símbolos: barra gris, biomasa; barra negra, etanol; línea continua, tiempo.....	75
Figura 25. Fase exponencial en la curva de producción de biomasa durante el proceso de fermentación discontinua de etanol. Símbolos: círculos cerrados, datos experimentales; línea continua, pendiente de la fase de crecimiento exponencial.	76
Figura 26. Curva de producción de biomasa y el resultado de ajustar la ecuación logística integrada a los datos experimentales obtenidos durante el proceso de fermentación discontinua de etanol. Símbolos: círculos cerrados, datos experimentales; línea continua, curva ajustada.	77
Figura 27. Correlación entre la concentración de biomasa calculada por el modelo logístico y los datos experimentales. Símbolos: línea punteada, banda de confianza del 95%; línea continua, coeficiente de correlación de 1.	79
Figura 28. Tasa de producción de biomasa obtenidos durante el proceso de fermentación discontinua de etanol en condiciones óptimas de operación.	80
Figura 29. Curva de producción de biomasa y el resultado de ajustar la ecuación de Gompertz modificado a los datos experimentales obtenidos durante el proceso de fermentación discontinua de etanol. Símbolos: círculos cerrados, datos experimentales; línea continua, curva ajustada.	81
Figura 30. Correlación entre la concentración de biomasa calculada por el modelo de Gompertz modificado y los datos experimentales. Símbolos: línea punteada, banda de confianza del 95%; línea continua, coeficiente de correlación de 1.	82
Figura 31. Crecimiento de biomasa, consumo de glucosa y producción de etanol en la fermentación discontinua, con el modelo de Andrew y Levenspiel. Símbolos: figuras sólidas, datos experimentales; línea continua, curva ajustada.	85
Figura 32. Correlación entre la concentración de biomasa, etanol y glucosa calculados por el modelo de Andrew y Levenspiel y los datos experimentales. Símbolos: línea punteada, banda de confianza del 95%; línea continua, coeficiente de correlación de 1.	86
Figura 33. Curva de producción de biomasa del pre – experimento, en condiciones de operación de pH (4), temperatura (35°C) y concentración de levadura (3g/L).	101



Figura 34. Curva de crecimiento biomasa en fermentación discontinua con las condiciones de operación de pH (4), temperatura (25°C) y concentración de levadura (1g/L) aplicando el método analítico de peso seco.....	104
Figura 35. Curva de crecimiento de biomasa en fermentación discontinua con las condiciones de operación de pH (4), temperatura (35°C) y concentración de levadura (1g/L) aplicando el método analítico de peso seco.....	106
Figura 36. Curva de crecimiento de biomasa en fermentación discontinua con las condiciones de operación de pH (5), temperatura (25°C) y concentración de levadura (1g/L) aplicando el método analítico de peso seco.....	109
Figura 37. Curva de crecimiento de biomasa en fermentación discontinua con las condiciones de operación de pH (5), temperatura (35°C) y concentración de levadura (1g/L) aplicando el método analítico de peso seco.....	111
Figura 38. Curva de crecimiento de biomasa en fermentación discontinua con las condiciones de operación de pH (4), temperatura (25°C) y concentración de levadura (3g/L) aplicando el método analítico de peso seco.....	114
Figura 39. Curva de crecimiento de biomasa en fermentación discontinua con las condiciones de operación de pH (4), temperatura (35°C) y concentración de levadura (3g/L) aplicando el método analítico de peso seco. Réplica.....	116
Figura 40. Curva de crecimiento de biomasa en fermentación discontinua con las condiciones de operación de pH (5), temperatura (25°C) y concentración de levadura (3g/L) aplicando el método analítico de peso seco.....	119
Figura 41. Curva de crecimiento de biomasa en fermentación discontinua con las condiciones de operación de pH (5), temperatura (35°C) y concentración de levadura (3g/L) aplicando el método analítico de peso seco.....	121
Figura 42. Curva de crecimiento de biomasa en fermentación discontinua con las condiciones de operación de pH (4,5), temperatura (30°C) y concentración de levadura (2g/L) aplicando el método analítico de peso seco.....	124
Figura 43. Curva de crecimiento de biomasa en fermentación discontinua con las condiciones de operación de pH (4,5), temperatura (30°C) y concentración de levadura (2g/L) aplicando el método analítico de peso seco. Réplica.....	126
Figura 44. Fotografía del árbol de cacao CCN – 51. Tomada en el Sector La Troncal.	133

Figura 45. Fotografía de la recolección de las mazorcas de cacao CCN – 51. Tomada en el Sector La Troncal.....	133
Figura 46. Fotografía de las mazorcas de cacao CCN – 51. Tomada en el Laboratorio de Tecnología de Conservas Vegetales.	133
Figura 47. Fotografía del mucílago de cacao CCN – 51. Tomada en el Laboratorio de Tecnología de Conservas Vegetales.	133
Figura 48. Fotografía del ablandamiento del mucílago de cacao CCN – 51. Tomada en el Laboratorio de Tecnología de Conservas Vegetales.....	134
Figura 49. Fotografía de la fluidización del mucílago de cacao CCN – 51. Tomada en el Laboratorio de Tecnología de Conservas Vegetales.....	134
Figura 50. Fotografía de la pasteurización del mucílago de cacao CCN – 51. Tomada en el Laboratorio de Tecnología de Conservas Vegetales.....	134
Figura 51. Fotografía de la esterilización de los recipientes. Tomada en el Laboratorio de Tecnología de Conservas Vegetales.	134
Figura 52. Fotografía del evacuado del mucílago de cacao CCN – 51. Tomada en el Laboratorio de Tecnología de Conservas Vegetales.....	134
Figura 53. Fotografía del almacenado (-18°C) del mucílago de cacao CCN – 51. Tomada en el Laboratorio de Tecnología de Conservas Vegetales.....	134
Figura 54. Fotografía del armado del Biorreactor. Tomada en el Laboratorio de Energía e Ingeniería de la Reacción.....	134
Figura 55. Fotografía de la medición del mucílago de cacao CCN – 51. Tomada en el Laboratorio de Energía e Ingeniería de la Reacción.....	134
Figura 56. Fotografía del llenado del Biorreactor con mucílago de cacao CCN – 51. Tomada en el Laboratorio de Energía e Ingeniería de la Reacción.....	134
Figura 57. Fotografía del establecimiento de las condiciones de operación en el Biorreactor. Tomada en el Laboratorio de Energía e Ingeniería de la Reacción.....	134
Figura 58. Fotografía de la Levadura Levapan. Tomada en el Laboratorio de Energía e Ingeniería de la Reacción.....	134
Figura 59. Fotografía del pesaje de la levadura <i>S. cerevisiae</i> . Tomada en el Laboratorio de Energía e Ingeniería de la Reacción.....	134
Figura 60. Fotografía de la fermentación del mucílago de cacao CCN – 51. Tomada en el Laboratorio de Energía e Ingeniería de la Reacción.....	134



Figura 61. Fotografía del pesaje del tubo vacío. Tomada en el Laboratorio de Energía e Ingeniería de la Reacción.....	134
Figura 62. Fotografía de la toma de muestra. Tomada en el Laboratorio de Energía e Ingeniería de la Reacción.....	134
Figura 63. Fotografía del pesaje del tubo más muestra. Tomada en el Laboratorio de Energía e Ingeniería de la Reacción.	134
Figura 64. Fotografía de la revisión de los °Brix del mucílago de cacao CCN – 51 fermentado. Tomada en el Laboratorio de Energía e Ingeniería de la Reacción.....	134
Figura 65. Fotografía del secado de muestra. Tomada en el Laboratorio de Energía e Ingeniería de la Reacción.....	134
Figura 66. Fotografía del pesaje del tubo más muestra seca. Tomada en el Laboratorio de Energía e Ingeniería de la Reacción.	134

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Composición química del cacao	26
Tabla 2. Constituyentes del mucílago de cacao	31
Tabla 3. Propiedades físico – químicas del mucílago de cacao CCN- 51	31
Tabla 4. Características de las levaduras	32
Tabla 5. Composición típica de las levaduras.....	32
Tabla 6. Característica fisiológica de las levaduras: Temperatura	33
Tabla 7. Característica fisiológica de las levaduras: pH.....	33
Tabla 8. Característica fisiológica de las levaduras: Nutrición	34
Tabla 9. Contenido de aminoácidos en extracto de la levadura <i>S. cerevisiae</i>	38
Tabla 10. Ventajas relevantes de la levadura <i>S. cerevisiae</i>	39
Tabla 11. Composición química de la levadura <i>S. cerevisiae</i> como materia seca.....	39
Tabla 12. Elementos básicos necesarios para el crecimiento de la levadura <i>S. cerevisiae</i>	40
Tabla 13. Característica fisiológica de la levadura <i>S. cerevisiae</i> : pH.....	40
Tabla 14. Condiciones de operación para procesos fermentativos según varios autores	43
Tabla 15. Ventajas y desventajas de la fermentación discontinua.....	46
Tabla 16. Ventajas y desventajas de la fermentación continua	46
Tabla 17. Variables y niveles para el diseño experimental.....	56
Tabla 18. Matriz de diseño factorial completo 2^3	56
Tabla 19. Resultados obtenidos a partir del método analítico peso seco con sus respectivos porcentajes de error. Experimento 6 de la matriz experimental	65
Tabla 20. Concentración de biomasa a partir del método analítico peso seco. Experimento 6 de la matriz experimental.....	66
Tabla 21. Concentraciones de biomasa aplicando el método analítico peso seco a diferentes condiciones de operación	68
Tabla 22. Matriz de diseño estadístico.....	69
Tabla 23. Resultados de las interacciones de los efectos.....	69
Tabla 24. Comparación de las concentraciones finales de biomasa y etanol con sus respectivos tiempos de fermentación alcohólica	75
Tabla 25. Parámetros cinéticos obtenidos con el modelo logístico	77
Tabla 26. Parámetros cinéticos obtenidos con el modelo de Gompertz modificado	800



Tabla 27. Parámetros cinéticos obtenidos con el modelo de Andrew y Levenspiel	84
Tabla 28. Coeficientes de determinación (R^2) del modelo de Andrew y Levenspiel.....	86
Tabla 29. Resultados del pre – experimento, en condiciones de operación de pH (4), temperatura (35°C) y concentración de levadura (3g/L).....	100
Tabla 30. Resultados obtenidos a partir del método analítico peso seco con sus respectivos porcentajes de error. Experimento 1 de la matriz experimental	102
Tabla 31. Concentración de biomasa a partir del método analítico peso seco. Experimento 1 de la matriz experimental.....	103
Tabla 32. Resultados obtenidos a partir del método analítico peso seco con sus respectivos porcentajes de error. Experimento 2 de la matriz experimental	105
Tabla 33. Concentración de biomasa a partir del método analítico peso seco. Experimento 2 de la matriz experimental.....	106
Tabla 34. Resultados obtenidos a partir del método analítico peso seco con sus respectivos porcentajes de error. Experimento 3 de la matriz experimental	107
Tabla 35. Concentración de biomasa a partir del método analítico peso seco. Experimento 3 de la matriz experimental.....	108
Tabla 36. Resultados obtenidos a partir del método analítico peso seco con sus respectivos porcentajes de error. Experimento 4 de la matriz experimental	110
Tabla 37. Concentración de biomasa a partir del método analítico peso seco. Experimento 4 de la matriz experimental.....	111
Tabla 38. Resultados obtenidos a partir del método analítico peso seco con sus respectivos porcentajes de error. Experimento 5 de la matriz experimental	112
Tabla 39. Concentración de biomasa a partir del método analítico peso seco. Experimento 5 de la matriz experimental.....	113
Tabla 40. Resultados obtenidos a partir del método analítico peso seco con sus respectivos porcentajes de error. Experimento 6 de la matriz experimental: Réplica.....	115
Tabla 41. Concentración de biomasa a partir del método analítico peso seco. Experimento 6 de la matriz experimental: Réplica	116
Tabla 42. Resultados obtenidos a partir del método analítico peso seco con sus respectivos porcentajes de error. Experimento 7 de la matriz experimental	117
Tabla 43. Concentración de biomasa a partir del método analítico peso seco. Experimento 7 de la matriz experimental.....	118



Tabla 44. Resultados obtenidos a partir del método analítico peso seco con sus respectivos porcentajes de error. Experimento 8 de la matriz experimental	120
Tabla 45. Concentración de biomasa a partir del método analítico peso seco. Experimento 8 de la matriz experimental.....	121
Tabla 46. Resultados obtenidos a partir del método analítico peso seco con sus respectivos porcentajes de error. Experimento 9 de la matriz experimental	122
Tabla 47. Concentración de biomasa a partir del método analítico peso seco. Experimento 9 de la matriz experimental.....	123
Tabla 48. Resultados obtenidos a partir del método analítico peso seco con sus respectivos porcentajes de error. Experimento 9 de la matriz experimental: Réplica.....	125
Tabla 49. Concentración de biomasa a partir del método analítico peso seco. Experimento 9 de la matriz experimental: Réplica	126

NOMENCLATURA

K_{IP}	Constante de inhibición de sustrato para la formación de etanol, g/L
K_{IS}	Constante de inhibición del sustrato para el crecimiento, g/L
K_S	Constante de Monod para el crecimiento, g/L
K_{SP}	Constante de saturación de etanol, g/L
m	Coefficiente de mantenimiento celular, h ⁻¹
P_E	Concentración de etanol, g/L
$P_{P.max}$	Concentración máxima de etanol para la fermentación de etanol, g/L
$P_{X.max}$	Concentración máxima de etanol para el crecimiento, g/L
$r_{p.m}$	Tasa máxima de producción de etanol, g/Lh
r_m	Tasa máxima de producción de biomasa, g/Lh
v_m	Tasa media en el intervalo estudiado.
r_1, r_2	Punto inicial P_1 y final P_2 del movimiento, respectivamente.
q_{max}	Tasa máxima de producción específica de etanol, g/g h
S	Concentración de Sustrato, g/L
t	Tiempo de fermentación, h
t_0	Tiempo de incubación al comienzo de la fase logarítmica, h
t_L	Tiempo de incubación al final de la fase logarítmica, h
t_l	Fase de retraso o tiempo de retraso desde el comienzo de la fermentación hasta el crecimiento exponencial o la producción de etanol, h
t_1, t_2	Instantes de tiempo en los que el cuerpo se encuentra en el punto inicial P_1 y final P_2 , respectivamente.
X	Concentración celular, g/L
X_0	Concentración celular al comienzo de la fase logarítmica, g/L
X_L	Concentración celular al final de la fase logarítmica, g/L
X_i	Concentración celular inicial, g/L
X_{max}	Máxima concentración celular, g/L
$Y_{P/S}$	Rendimiento de etanol, g/g
$Y_{X/S}$	Rendimiento de biomasa, g/g
μ	Tasa de crecimiento específico, h ⁻¹
μ_{max}	Tasa de crecimiento específico máximo, h ⁻¹
α, β	Constante de inhibición de etanol, g/L



Jessica Valeria Guncay Buestán en calidad de autora y titular de los derechos morales y patrimoniales del trabajo de titulación "*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*", de conformidad con el Art. 114 del CÓDIGO ORGÁNICO DE LA ECONOMÍA SOCIAL DE LOS CONOCIMIENTOS, CREATIVIDAD E INNOVACIÓN reconozco a favor de la Universidad de Cuenca una licencia gratuita, intransferible y no exclusiva para el uso no comercial de la obra, con fines estrictamente académicos.

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

Cuenca, 23 de mayo del 2018

A handwritten signature in blue ink, appearing to read "Jessica Valeria Guncay Buestán", written over a horizontal line.

Jessica Valeria Guncay Buestán

C.I: 0105625727



Marco Vinicio Silva Ibarra en calidad de autor y titular de los derechos morales y patrimoniales del trabajo de titulación "*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*", de conformidad con el Art. 114 del CÓDIGO ORGÁNICO DE LA ECONOMÍA SOCIAL DE LOS CONOCIMIENTOS, CREATIVIDAD E INNOVACIÓN reconozco a favor de la Universidad de Cuenca una licencia gratuita, intransferible y no exclusiva para el uso no comercial de la obra, con fines estrictamente académicos.

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

Cuenca, 23 de mayo del 2018

A handwritten signature in blue ink, appearing to read "Marco Vinicio Silva Ibarra", written over a horizontal line.

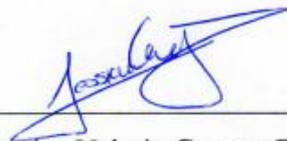
Marco Vinicio Silva Ibarra

C.I: 0106516610



Jessica Valeria Guncay Buestán, autora del Trabajo de Titulación “*Optimización de la producción de biomasa en procesos fermentativos del mucilago de cacao CCN – 51 aplicando la ecuación logística integrada y el modelo de Andrew y Levenspiel, bajo diferentes condiciones de operación*”, certifico que todas las ideas, opiniones y contenidos expuestos en la presente investigación son de exclusiva responsabilidad de su autora.

Cuenca, 23 de mayo del 2018



Jessica Valeria Guncay Buestán
C.I: 0105625727



Marco Vinicio Silva Ibarra, autor del Trabajo de Titulación "Optimización de la producción de biomasa en procesos fermentativos del mucilago de cacao CCN – 51 aplicando la ecuación logística integrada y el modelo de Andrew y Levenspiel, bajo diferentes condiciones de operación", certifico que todas las ideas, opiniones y contenidos expuestos en la presente investigación son de exclusiva responsabilidad de su autor.

Cuenca, 23 de mayo del 2018

A handwritten signature in blue ink, appearing to read "M. Silva Ibarra", written over a horizontal line.

Marco Vinicio Silva Ibarra

C.I: 010651660

DEDICATORIA

Con todo mi amor a la memoria de mi mamá, Sra. Rosa Carmelina Buestán por haberme apoyado en todo momento, por sus consejos, sus valores, por la motivación constante que me permitió ser una persona de bien, pero más que nada, por su amor incondicional.

Con cariño para mi papá, Sr. Carlos Oswaldo Guncay por brindarme su apoyo emocional y económico incondicional a lo largo de mi trayectoria porque ha sido un sustento para poder culminar mi carrera profesional.

A mi querida abuelita, Sra. María Adelaida Sánchez por brindarme cariño, amor, comprensión y apoyo en todo momento, gracias por siempre estar ahí cuando te necesito.

Al dueño de mis latidos, Lcdo. Hugo Xavier, porque en su compañía las cosas malas se convertían en buenas, la tristeza se transformaba en alegría y la soledad no existía, pero sobre todo gracias por siempre haber confiado en mí. Lo amo.

“Nada en este mundo puede reemplazar la persistencia. El talento no puede hacerlo: nada es más común que hombres fracasados con talento. El genio no puede hacerlo: un genio sin recompensa es casi un proverbio. La educación no puede hacerlo: el mundo está lleno de indigentes educados. Solo la persistencia y la determinación son omnipotentes.”

Calvin Coolidge

Jessica Valeria Guncay Buestán



DEDICATORIA

Quiero dedicar este logro a mis padres, por su amor, su sacrificio, su cariño y el apoyo incondicional que me han brindado, a mi hermano Jorge quien siempre fue mi ejemplo a seguir y a mi hermano Cristian quien me guía y me protege en espíritu.

Ellos siempre han sido y serán mi principal inspiración en la vida.

Marco Vinicio Silva Ibarra



AGRADECIMIENTOS

Esta tesis de pregrado, si bien ha requerido de esfuerzo y mucha dedicación por parte de los autores y su director de tesis, no hubiese sido posible su finalización sin la cooperación desinteresada de todas y cada una de las personas que a continuación citaremos.

Primero y, antes que nada, agradecemos a Dios, por permitirnos vivir este momento en el cual se refleja todo el esfuerzo y dedicación que hemos tenido a lo largo de nuestra carrera profesional, y por haber puesto en nuestro camino a aquellas personas que han sido nuestro soporte y compañía durante todo el periodo de estudio.

Agradecer hoy y siempre a nuestros padres porque si no fuese por el esfuerzo realizado por ellos, nuestros estudios no hubiesen sido posible, y que con el apoyo y alegría que nos brindan nos dan la fortaleza necesaria para seguir adelante.

De igual manera nuestro más sincero agradecimiento a nuestro director de tesis, el Mgst. Jorge Delgado quien dirigió este estudio con dedicación y esmero, y a través de su constante exigencia y cada sabia palabra, nos ha mostrado nuestro rol en la sociedad, más allá de lo profesional y laboral. Agradecemos también a la Mgst. Verónica Saetama y al Mgst. Mario Peña, quienes, con interés y carisma, nos brindaron su tiempo, apoyo y disposición frente a todas nuestras inquietudes durante el desarrollo de nuestro trabajo. De igual manera a todo el personal del Laboratorio Tecnológico de la Facultad de Ciencias Químicas, por su constante disposición, colaboración y apoyo durante todo el proceso de desarrollo de este trabajo, ya que dentro de los ámbitos que a cada uno le competen nos han colaborado sin ponernos ningún impedimento, al contrario, nos han brindado siempre una sonrisa.

En general queremos agradecer a todas y cada una de las personas que han vivido con nosotros la realización de esta tesis de pregrado, con sus altos y bajos y que no necesitamos nombrar porque tanto ellas como nosotros sabemos que desde los más profundo de nuestros corazones les agradecemos el habernos brindado todo el apoyo, colaboración, ánimo y sobre todo cariño y amistad.



1. INTRODUCCIÓN

En la actualidad los principales recursos energéticos empleados a nivel mundial son el petróleo, carbón y gas natural. A medida que la población aumenta la demanda energética también lo hace, lo cual provoca que la explotación de estos recursos se intensifique generando gases de efecto invernadero, efectos en el cambio climático y agotamiento de los mismos (Salaet y Roca, 2009).

En el siglo XXI, existe un acuerdo global en el que el desafío del sector energético es proporcionar energía económicamente viable, pero que al mismo tiempo reduzca el impacto ambiental, por lo que es indispensable que se dé una renovación del sector energético a escala global. Algunos países desarrollados y países en desarrollo están utilizando fuentes alternativas de energía como son los biocombustibles (Zarrilli, 2006), siendo los más usados el bioetanol y el biodiesel, cuyas ventajas son: reducción de gases de efecto invernadero; disminución de la dependencia energética que produce el petróleo; reducción de las importaciones de combustibles; aumento del valor de los subproductos agrícolas de los que proceden, pudiendo mejorar los ingresos de los habitantes rurales y por ende elevando su nivel de vida; generación de nuevos puestos de trabajo a lo largo de toda la cadena de producción de biocombustibles; entre otros (López, 2008; Saulino, 2011; Texo, Betancur, y Duque, 2009). La producción de bioetanol y biodiesel a nivel mundial en el 2017 fue 127 y 24 mil millones de litros, respectivamente (Programa Mundial de Evaluación de los Recursos Hídricos [WWAP], 2017).

En el Ecuador existe un enfoque en el desarrollo de nuevas formas de aprovechamiento y creación de recursos más amigables con el medio ambiente, es así que actualmente se producen a escala industrial biocombustibles como son el Ecopaís (95% gasolina y 5% bioetanol) y biodiésel (95% diésel y 5% biodiésel) (Norma Técnica Ecuatoriana [NTE INEN] 1489:2012 Séptima revisión, 2013). En el 2017 se tuvo una producción de etanol para biocombustible de aproximadamente 75 millones de litros (Ministerio de Industrias y Productividad [MIPRO], 2017), sin embargo la meta del Gobierno es llegar a cuadruplicar este valor (Instituto de promoción de exportaciones e inversiones [PRO ECUADOR], 2013).



Ecuador genera gran cantidad de residuos de materia orgánica (biomasa) proveniente del sector agrícola, que a pesar de su importancia como potencial energético no es aprovechado. Entre los principales cultivos con potencial energético y mayor volumen de producción de residuos están: palma africana, banano, arroz, y cacao que generan cerca de 6,9; 4,9; 2,1 y 2,0 millones de toneladas anuales de residuos, respectivamente (ESIN Consultora S.A., 2014).

En la industria cacaotera se aprovecha únicamente la semilla la cual representa el 10% del peso del fruto seco, el resto de sus componentes como son el casco exterior (80% – 90%), el mucílago (1% – 2%) y la cáscara de grano no son aprovechados industrialmente (Sánchez, 2013). El mucílago es un residuo que puede provocar aparición de olores fétidos, deterioro del paisaje y problemas de disposición de desechos causando problemas ambientales, sin embargo, por su alto contenido en diferentes tipos de azúcares, este subproducto es un excelente medio para el crecimiento de microorganismos, es así que se han desarrollado varios estudios sobre los posibles usos como materia prima en la producción de etanol, pectinas, alimentación animal, entre otros (López, 2017); razón por la cual se plantea la aplicación de este residuo en la producción de bioetanol como biocombustible, contribuyendo de esta manera a la mejor explotación de los recursos naturales, a la fabricación de biocombustibles y al cambio de la matriz productiva y energética (Luzuriaga, 2012; Vallejo, et al., 2016).

El objetivo general de este estudio es optimizar las variables que intervienen en la producción de biomasa en procesos fermentativos del mucílago de cacao *Colección Castro Naranjal* (CCN – 51) aplicando la ecuación logística integrada y el modelo de Andrew y Levenspiel, bajo diferentes condiciones de operación; y los objetivos específicos son: analizar las curvas de concentración de biomasa obtenidas bajo diferentes condiciones de temperatura, pH y concentración de levadura *S. cerevisiae*, mediante la aplicación del método analítico peso seco; determinar las condiciones óptimas de operación a partir de los resultados del método analítico empleado; y modelar la producción de biomasa con las condiciones óptimas de operación, usando el modelo logístico y el modelo de Andrew y Levenspiel.

2. CONTENIDO TEÓRICO

2.1. Cacao

2.1.1. Generalidades.

El cacao (*Theobroma cacao*) se encuentra distribuido en varios países del mundo entre ellos en la amazonia de América Central y del Sur, sin embargo, su crecimiento es mayor en climas ecuatoriales donde hay abundantes precipitaciones durante todo el año y la temperatura es relativamente estable, de entre 25 – 28 grados centígrados. El árbol tiene un tiempo de crecimiento entre 4 – 5 años y su máxima producción de mazorcas es entre 8 – 10 años, esto dependerá del tipo de cacao y las condiciones de la zona (PRO ECUADOR, 2013).

En cuanto a su característica morfológica alcanza una altura media entre 5 – 8 metros, las flores son pequeñas y de pétalos largos. Las hojas tienen forma alargada con un tamaño de 30 centímetros aproximadamente y de color verde oscuro. La mazorca tiene forma alargada, su cáscara gruesa y puede brotar en la copa de los árboles y debajo de sus ramas. Dependiendo del tipo de cacao pueden presentar colores como amarillo, blanco, verde o rojo (Rosero, 2002).

Tabla 1
Composición química del cacao

Componentes %	1 ^a	2 ^b	3 ^c	4 ^d
Agua	5,0	4,5	8,5	0,50
Grasa	54,0	1,5	3,5	50,22
Cafeína	0,2	-	-	1,55
Teobromina	1,2	1,4	-	-
Polihidroxifenoles	6,0	-	-	-
Proteína bruta	11,5	10,9	25,1	14,04
Mono y oligosacáridos	1,0	0,1	2,3	
Almidón	6,0	-	-	26,98
Celulosa	9,0	26,5	4,3	
Ácidos Carboxílicos	1,5	-	-	3,76
Ceniza	2,6	8,0	6,3	

Fuente: (Wakao, 2002).

^a Composición de los granos de cacao fermentados y desecados al aire.

^b Cascara de Cacao. ^c Gérmenes o radículas de cacao. ^d Composición de los granos de cacao descascarado y tostado.

La composición química de los granos de cacao varía por diferentes factores como son: tipo de cacao, origen geográfico, grado de madurez, calidad de la fermentación y secado, y el subsecuente procesamiento de los granos. Los principales constituyentes (Tabla 1) que en general presenta el cacao son: grasa, compuestos fenólicos, materia nitrogenada, almidón (entre otros carbohidratos) y materia inorgánica (Morillo, 2005).

2.1.2. Variedades de Cacao en el Ecuador.

En la Figura 1, se muestran las cuatro variedades principales de cacao:

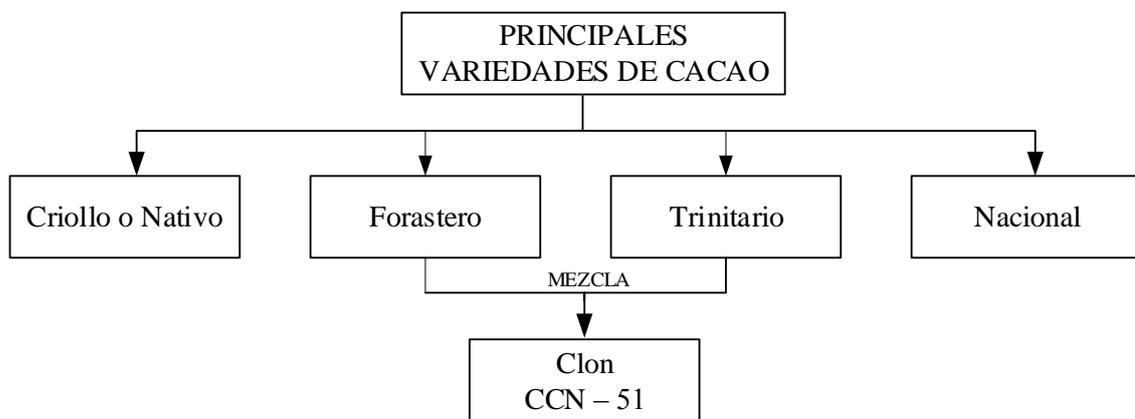


Figura 1. Principales variedades de cacao en el Ecuador.
Fuente: Adaptado de Lucero y Morales (2014).

2.1.2.1. Criollo o Nativo.



Figura 3. Cacao criollo o nativo maduro.
Fuente: (CasaLuker, 2016).

El término “criollo” fue atribuido por los españoles al cacao cultivado en Venezuela y América Central. En cuanto a su morfología tiene flores de color rosado pálido. Las mazorcas son de tamaño mediano, alargadas, con cáscara poca rugosa, de color rojo a amarillo cuando alcanza el estado de madurez. Posee entre 20 – 30 semillas de color blanco o crema, alto contenido de grasa y bastante aroma. En Ecuador se cultiva en la provincia de Esmeraldas (García, 2014)

2.1.2.2. Forastero.



Figura 5. Cacao forastero maduro.
Fuente: (Marroquin, 2011).

Los cacaos forasteros se denominan también como “Amazónicos”. Son originarios de América del sur, en América se localizan en la Amazonía de Colombia, Bolivia, Brasil, Ecuador, Perú y Venezuela. Se caracterizan por tener mazorcas pequeñas, de color verde claro o rosado pálido y en la madurez presentan color amarillo, su cáscara es lisa o ligeramente rugosa. Puede contener hasta más de 30 semillas por mazorca y son de color púrpura y de bajo contenido de grasa (Lucero y Morales, 2014).

Los cacaos forasteros se denominan también como “Amazónicos”. Son originarios de América del sur, en América se localizan en la Amazonía de Colombia, Bolivia, Brasil, Ecuador, Perú y Venezuela. Se caracterizan por tener mazorcas pequeñas, de color verde claro o rosado pálido y en la madurez presentan color amarillo, su cáscara es lisa o ligeramente rugosa. Puede contener hasta más de 30 semillas por mazorca y son de color púrpura y de bajo contenido de grasa (Lucero y Morales, 2014).

2.1.2.3. Trinitario.



Figura 7. Cacao trinitario maduro.
Fuente: (Gutiérrez, 2011).

El cacao trinitario tiene su origen en la Isla de Trinidad y Tobago, es el resultado del cruzamiento de las variedades de cacao criollo y forastero. Las mazorcas presentan color rojo, amarillo y anaranjado, de cáscara gruesa y algo rugosa. Debido a que es producto de un cruce entre variedades sus características y el grado de calidad son intermedias. Se cultiva en México, Centro América, Ecuador, Trinidad, Colombia, Venezuela, oeste de África y suroeste de Asia. De esta variedad se incluye el clon CCN – 51 que es el resultado de un programa de cruzamiento entre cacaos forasteros con trinitarios (Guevara y Salazar, 2015).

El cacao trinitario tiene su origen en la Isla de Trinidad y Tobago, es el resultado del cruzamiento de las variedades de cacao criollo y forastero. Las mazorcas presentan color rojo, amarillo y anaranjado, de cáscara gruesa y algo rugosa. Debido a que es producto de un cruce entre variedades sus características y el grado de calidad son intermedias. Se cultiva en México, Centro América, Ecuador, Trinidad, Colombia, Venezuela, oeste de África y suroeste de Asia. De esta variedad se incluye el clon CCN – 51 que es el resultado de un programa de cruzamiento entre cacaos forasteros con trinitarios (Guevara y Salazar, 2015).

2.1.2.3.1. Cacao CCN – 51.



Figura 9. Cacao CCN – 51 maduro.
Fuente: (Carrión, 2012).

Es un cacao clonado de origen ecuatoriano, cuyo responsable fue el agrónomo Homero Castro Zurita quien desarrolló el denominado clon en 1965, las siglas significan Colección Castro Naranja (Quizhpi, 2016). El 22 de junio de 2005 se declaró por un acuerdo ministerial a este tipo de cacao como un recurso de alta productividad. Además, es reconocido por su calidad y su tolerancia a las enfermedades (Asociación Nacional de Exportadores de Cacao [ANECACAO], 2015).

Es un cacao clonado de origen ecuatoriano, cuyo responsable fue el agrónomo Homero Castro Zurita quien desarrolló el denominado clon en 1965, las siglas significan Colección Castro Naranja (Quizhpi, 2016). El 22 de junio de 2005 se declaró por un acuerdo ministerial a este tipo de cacao como un recurso de alta productividad. Además, es reconocido por su calidad y su tolerancia a las enfermedades (Asociación Nacional de Exportadores de Cacao [ANECACAO], 2015).

2.1.2.4. Nacional.



Figura 11. Cacao nacional maduro.

Se considera al cacao nacional, como un cacao forastero por sus características morfológicas tanto de la mazorca como de la planta, mientras que por su calidad y sabor le dan a esta variedad ecuatoriana el nombre de “arriba” o forastero “fino” (Lucero y Morales, 2014). La mazorca presenta color verde y se torna amarilla cuando está madura, de cáscara media gruesa y la unión de los lomos (forma de punta) es conocida como “pico de loro”. Este cacao tiene características distintivas de aroma y sabor buscadas por los fabricantes de chocolate. Ecuador, por sus condiciones geográficas y su riqueza en recursos biológicos, es el productor por excelencia del cacao nacional (Poméon, 2008).

2.1.3. Producción de cacao en el Ecuador.

El cultivo de cacao en el Ecuador es una actividad muy importante para la economía nacional, siendo por muchos años la mayor fuente de ingresos. Se ha integrado como parte de la cultura de las comunidades rurales como cultivo tradicional del país (Quizhpi, 2016). El Ecuador posee una gran superioridad en este producto ya que el 70% de la producción mundial de cacao nacional se encuentra en territorio ecuatoriano.

En el 2012, fue el quinto producto más exportado dentro de las exportaciones no petroleras, después del banano, pescado, rosas y demás formas de oro para uso no monetario. En el mismo año se registró una exportación de cacao y sus elaborados por un total de 496,63 millones de dólares y 182,794 toneladas (PRO ECUADOR, 2013). En el año 2015 las exportaciones ecuatorianas de cacao en grano cerraron alcanzando un volumen total de 236,667 mil toneladas métricas, presentando un 10% de incremento en relación con el 2014 (ANECACAO, 2015).

La producción de cacao en 2016 mantuvo su tendencia creciente, aunque disminuyó debido a que las plantaciones no se encontraron en las mismas condiciones vegetativas del 2015, ya que fueron afectadas por plagas (monilla y escoba de bruja), lo que provocó

que los rendimientos sean menores, dando como resultado un crecimiento en el volumen de producción de apenas 2% (Banco Central del Ecuador [BCE], 2017).

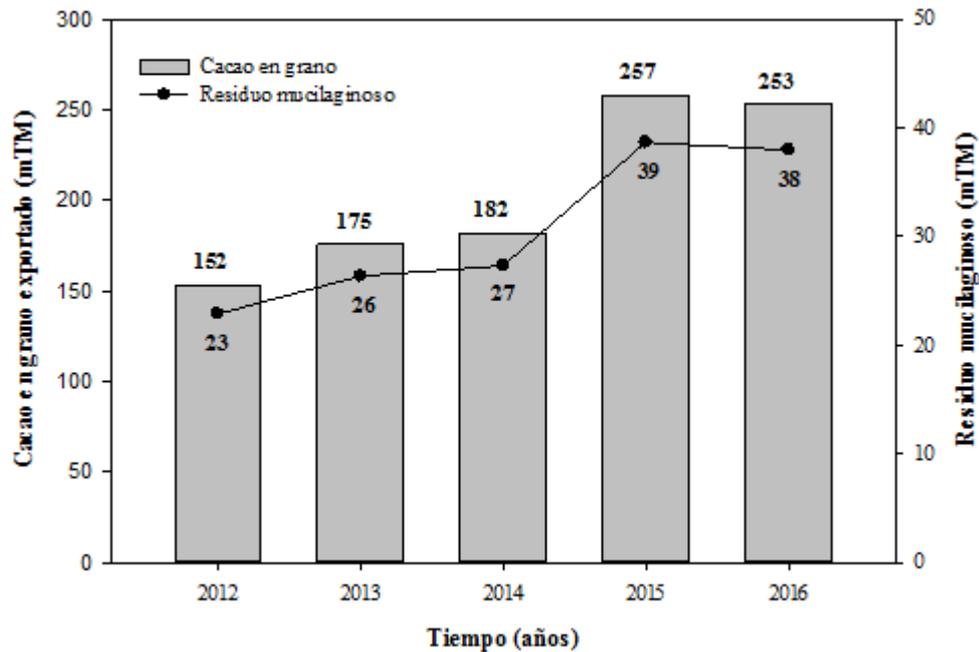


Figura 14. Exportación total del cacao ecuatoriano y residuo mucilaginoso.
Fuente: Adaptado de BCE (2017).

2.1.4. Mucílago de cacao.

El mucílago de cacao es la pulpa de sabor dulce y ácido que recubre los granos del fruto, su función es proveer las condiciones adecuadas para el proceso de fermentación y para la formación de sustancias precursoras del sabor y aroma.

Es un producto orgánico, cuya estructura molecular completa es desconocida. Están compuestos por polisacáridos celulósicos que contienen el mismo número de azúcares que las gomas y pectinas pudiendo diferenciarlas de estas, mediante las propiedades físicas. Presenta un pH ácido debido a la presencia de ácido cítrico, lo cual es un medio adecuado para las levaduras (Jiménez y Bonilla, 2012). En la Tabla 2, se muestran los constituyentes del mucílago de cacao.

Tabla 3
Constituyentes del mucílago de cacao

Componentes	Porcentaje en base húmeda
Agua	79,20 – 84,20
Proteína cruda	0,09 – 0,11
Azúcares	12,50 – 15,90
Glucosa	11,60 – 15,32
Sacarosa	0,11 – 0,90
Pectinas	0,90 – 1,19
Ácido cítrico	0,77 – 1,52
Cenizas	0,40 – 0,50

Fuente: (Vallejo, et al., 2016).

En la Tabla 3, se muestran las propiedades físico – químicas del mucílago de cacao CCN – 51.

Tabla 6
Propiedades físico – químicas del mucílago de cacao CCN – 51

Parámetros	Concentración	Unidad
Total de sólidos solubles	17,05 ± 0,86	Grados Brix
pH	± 3,86	-
Acidez titulable (ácido cítrico)	245,25 ± 21,19	meq/L
Azúcares reductores totales	12,56 ± 1,71	%
Densidad	1,06	g/mL

Fuente: (Quizhpi, 2016; Vallejo, et al., 2016).

2.2. Levaduras

2.2.1. Generalidades.

Las levaduras pueden ser empleadas en la alimentación humana debido a que raramente son patógenas o tóxicas. Son hongos unicelulares que tienen una morfología esférica muy característica, también pueden ser ovaladas, alimonadas, piriformes, cilíndricas, triangulares, e inclusive alargadas, que son observadas únicamente a través de un microscopio (Loray, 2002).

2.2.2. Características de las levaduras.

Las características morfológicas y químicas influyen de manera significativa en la vida celular de las levaduras (Guillermo y Macías, 2014). En la Tabla 4 se muestran las principales características de las mismas.

Tabla 9
Características de las levaduras

Descripción	Cantidad	Unidad
Dimensiones	4,0 – 8,0	µm
Tiempo de duplicación	1,0 – 3,0	h
pH (rango óptimo)	4,5 – 5,5	-
Nitrógeno	7,5 – 8,5	%
Proteína	35,0 – 45,0	%
Ácidos nucleicos	6,0 – 12,0	%
Carbohidratos	30,0 – 45,0	%

Fuente: (Guillermo y Macías, 2014).

2.2.3. Composición típica de las levaduras.

Algunos de los usos que tienen las levaduras están directamente relacionadas con su composición (Petrenko, 2005). La biomasa de la levadura tiene varios componentes, las mismas que se muestran en la Tabla 5.

Tabla 12
Composición típica de las levaduras

Componentes	%	Componentes	%
Proteínas	45,0 – 55,0	Calcio	0,6 – 1,3
Hidratos de carbono	25,0 – 35,0	Fósforo	1,4 – 1,7
Grasas	2,0 – 5,0	Potasio	1,2 – 1,9
Cenizas	6,0 – 8,0	Magnesio	0,1 – 0,2
Hierro	9,3 – 35,0 mg/%	Cobre	2,0 – 13,4 mg/%
Molibdeno	1,3 – 12,3 mg/%	Cinc	3,3 – 16,3 mg/%

Fuente: (Petrenko, 2005).

2.2.4. Características Fisiológicas.

Para que las levaduras crezcan de manera eficiente necesitan adecuados niveles de oxígeno, de fuentes de carbono orgánicas y nitrógeno mineral u orgánico, de diversos minerales, y una temperatura y pH adecuados (Guillermo y Macías, 2014).

2.2.4.1. Temperatura.

Las levaduras no son organismos termófilos (Uribe, 2007). En la Tabla 6 se muestran los valores de temperatura de crecimiento para las levaduras.

Tabla 15
Característica fisiológica de las levaduras: Temperatura

Temperatura [°C]	Descripción
5 – 37	Temperatura de crecimiento de la mayoría de las levaduras.
≥ 0	Temperatura de crecimiento de algunas levaduras.
25 – 35	Temperatura óptima de crecimiento de la mayoría de las levaduras.
35 – 47	Temperatura máxima de crecimiento de la mayoría de las levaduras.
≥ 52	Termodestrucción: células más sensibles en la fase exponencial que en la fase estacionaria.

Fuente: Adaptado de Uribe (2007).

2.2.4.2. pH.

En la Tabla 7 se muestran los valores de pH para el crecimiento de las levaduras.

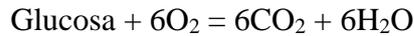
Tabla 18
Característica fisiológica de las levaduras: pH

pH	Descripción
4,0 – 6,5	pH óptimo para el crecimiento de las levaduras.
2,8 – 3,0 a 2,0 – 8,5	Variaciones de pH que toleran las levaduras.

Fuente: Adaptado de Alonso (2008).

2.2.4.3. Oxígeno.

Las levaduras pueden sobrevivir y crecer con o sin oxígeno, sin embargo, la mayoría de estas son consideradas como organismos aerobios facultativos. En un medio que se dispone de oxígeno (crecimiento aeróbico) las levaduras metabolizan los azúcares en dióxido de carbono y agua, es decir crecen eficientemente para producir biomasa; esto se aplica en los procesos de fermentación para la obtención de proteínas unicelulares. En un medio que se carece o tiene muy poco oxígeno (fermentación anaeróbica) las levaduras fermentan los azúcares en dióxido de carbono y etanol, lo que se traduce en la formación de menor cantidad de biomasa; este tipo de fermentación se aplica en las industrias cervecera y vinícola (Ortiz, 2015).

Ecuación 1: Crecimiento aeróbico**Ecuación 2:** Fermentación anaeróbica**2.2.4.4. Nutrición.**

En la Tabla 8 se muestran las principales fuentes de nutrición para el crecimiento de las levaduras.

Tabla 21

Característica fisiológica de las levaduras: Nutrición

Fuentes de Nutrición	Descripción
Carbono orgánico	Es el compuesto que en mayor cantidad está presente en las levaduras, aproximadamente un 50% del peso seco.
Compuestos carbonados	Estos compuestos (D – glucosa, D – fructosa y D – manosa) son utilizados como fuente de carbono y energía por las levaduras.
Otros	Azúcares, aldehídos, sales de algunos ácidos orgánicos, glicerina o etanol y ocasionalmente estas fuentes de carbono pueden ser suministradas dependiendo del tipo de levadura.

Fuente: Adaptado de Torres (2007).

2.2.5. Principales usos de las levaduras.

En la Figura 8 se muestran los principales usos de las levaduras.

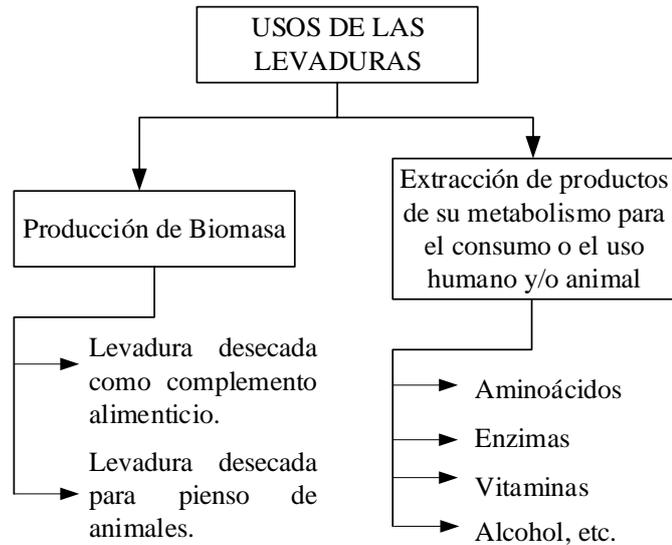


Figura 17. Principales usos de las levaduras.
Fuente: Adaptado de Suárez, Garrido y Guevara (2016).

2.2.6. Crecimiento celular.

La reproducción de las levaduras es asexual por división celular. La levadura original genera una yema, la cual se desprende para formar un nuevo individuo, esto sucede siempre cuando las condiciones del medio, condiciones de nutrientes, temperatura, pH entre otros sean las adecuadas; influyendo de forma directa en la velocidad con que estas pueden llegar a reproducirse (Cattaneo, Larcher, Togo, y Chailo, 2007).

En la Figura 9 se muestran las diferentes fases de crecimiento celular, las mismas que se desarrollan mediante un ciclo denominado ciclo de crecimiento según distintos autores. Este ciclo permite describir la forma como cambia la concentración celular o de biomasa (Arredondo y Voltolina, 2007).

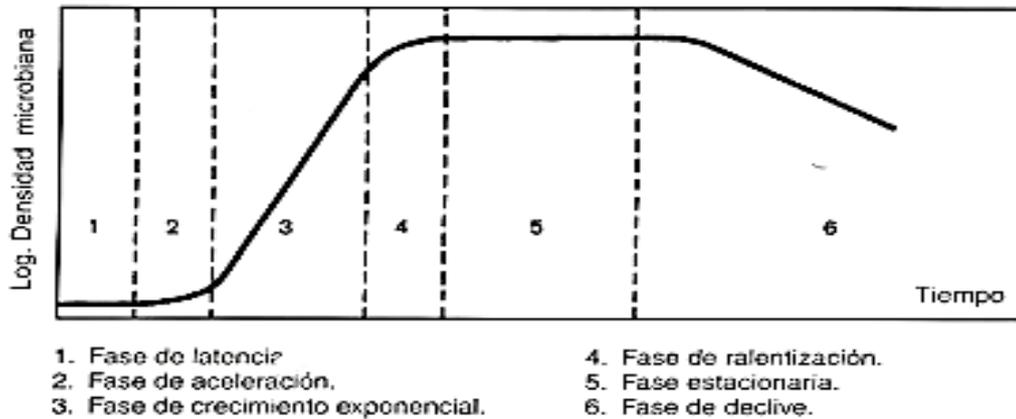


Figura 20. Ciclo de crecimiento de las levaduras.
Fuente: (Macías y Saavedra, 2017).

2.2.6.1. Fase de latencia.

También se la conoce como fase de adaptación en la cual las células se van adaptando al medio y posteriormente inician su multiplicación. Esta fase puede verse afectada (retardo del crecimiento celular en la fase inicial) por las condiciones ambientales como temperatura, iluminación y pH (Arredondo y Voltolina, 2007; Fuidio, 2014). La velocidad específica de crecimiento es igual a cero ($\mu = 0$) (Castillo, 2013).

2.2.6.2. Fase de aceleración.

Durante esta fase se incrementan secuencialmente diferentes componentes estructurales (ácido ribonucleico, proteínas y del peso individual), siendo la concentración celular la última en incrementarse (Arredondo y Voltolina, 2007). La velocidad específica de crecimiento es menor a la velocidad específica máxima de crecimiento ($\mu < \mu_{max}$) (Castillo, 2013).

2.2.6.3. Fase de crecimiento exponencial.

En esta fase la velocidad de crecimiento celular permanece aproximadamente constante debido a la falta de factores limitantes; es decir, aumenta la población de levaduras (Arredondo y Voltolina, 2007; Fuidio, 2014). La velocidad específica de crecimiento es aproximadamente igual a la velocidad específica máxima de crecimiento ($\mu \approx \mu_{max}$) (Castillo, 2013).



2.2.6.4. Fase de ralentización.

También se la conoce como fase de desaceleración, la velocidad de crecimiento celular empieza a disminuir debido a que existe una menor disponibilidad de uno de los factores que regulan el crecimiento, en consecuencia, el aumento de la población de levaduras ya no es constante, pero debido al alto número de células, la concentración celular alcanza su máximo valor (Arredondo y Voltolina, 2007).

2.2.6.5. Fase estacionaria.

En esta fase la concentración celular y los componentes de biomasa permanecen sin cambios relevantes (se mantienen aproximadamente constantes) debido a que las condiciones del medio son limitantes. Este comportamiento se debe a la poca disponibilidad de algún nutriente esencial y por la alta concentración de etanol ya que en un punto este alcanza niveles inhibitorios (Arredondo y Voltolina, 2007; Fuidio, 2014). La velocidad específica de crecimiento es menor a la velocidad específica máxima de crecimiento ($\mu < \mu_{max}$) (Castillo, 2013).

2.2.6.6. Fase de declive.

También se la conoce como fase de muerte debido a que la concentración celular disminuye por la ausencia de nutrientes (no hay más azúcares y el contenido de etanol es muy alto), que conlleva a la muerte celular (Arredondo y Voltolina, 2007; Fuidio, 2014). La velocidad específica de crecimiento es menor a cero ($\mu < 0$) (Castillo, 2013).

2.2.7. *Saccharomyces Cerevisiae*.

Esta especie presenta células alargadas, esféricas o elipsoidales; pueden encontrarse agrupadas de dos, en cortas cadenas, también en racimos o simplemente solas. Las colonias de estas levaduras son muy diversas, pueden presentar un color crema o levemente café, de aspecto liso a rugoso, brillante u opacas que en ocasiones suelen estar sectorizadas (Sánchez, 2011; Valdés, et al., 2015).

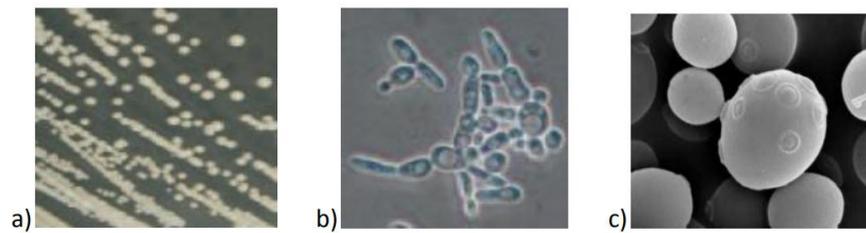


Figura 23. Crecimiento de *S. cerevisiae* en: a) agar dextrosa saboraud, b) microscopía de contraste de fases x580 aumentos y c) microscopía electrónica de barrido, x7040 aumentos.

Fuente: (A. Sánchez, 2011).

Las condiciones óptimas de temperatura y pH para el crecimiento de este microorganismo son entre 25 – 35 grados centígrados y pH's ácidos, respectivamente; la aireación óptima es de 0,6 – 0,9 volumen de aire por volumen de medio por minuto. Es un microorganismo anaeróbico con la capacidad de fermentar azúcares como: glucosa, galactosa, sacarosa, fructosa y maltosa presentes en el mosto; y no fermentar lactosa. Asimila galactosa, sacarosa, maltosa y rafinosa. Con la presencia de oxígeno pueden metabolizar oxidativamente sustratos como glicerol, etanol y lactato (Petrenko, 2005; A. Sánchez, 2011). En Tabla 9 se muestra el contenido de aminoácidos en el extracto la levadura *S. cerevisiae*.

Tabla 24

Contenido de aminoácidos en extracto de la levadura S. cerevisiae

Aminoácidos	%	Aminoácidos	%
Lisina	8,2	Valina	5,5
Histidina	4,0	Isoleucina	5,5
Arginina	5,0	Tirosina	5,0
Leucina	7,9		

Fuente: (Petrenko, 2005).

Esta especie se emplea con mucha frecuencia en la industria alimentaria, empleando cepas específicas en fermentaciones: del pan (panificación), de la cerveza, del vino; así como en la producción de alcohol, glicerol e invertasa. A nivel industrial es utilizado frecuentemente para la obtención de etanol, debido a que este microorganismo presenta varias ventajas las mismas se muestran en la Tabla 10 (Fajardo y Sarmiento, 2007; Oliva, 2012; Petrenko, 2005).

Tabla 27*Ventajas relevantes de la levadura S. cerevisiae*

Ventajas de la Levadura <i>S. cerevisiae</i>	
<ul style="list-style-type: none"> ▪ Fácil de manipular y recuperar. ▪ Fácil de cultivar. ▪ No tiene un alto costo económico. ▪ Tolera altas concentraciones de etanol. ▪ Durante la fermentación produce bajos niveles de subproductos. ▪ Es osmotolerante. 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Capaz de utilizar altas concentraciones de azúcares ▪ Presenta alta viabilidad celular para el reciclado. ▪ Características de floculación y sedimentación para el procesamiento posterior.

Fuente: Adaptado de Fajardo y Sarmiento (2007).

2.2.7.1. Composición química.

La levadura *S. cerevisiae* contiene aproximadamente un 75% de agua y un 25% de materia seca (Fajardo y Sarmiento, 2007). La composición de la materia seca de la levadura se muestra en la Tabla 11.

Tabla 30*Composición química de la levadura S. cerevisiae como materia seca*

Componentes	%
Ceniza	7
Carbohidratos	43
Proteína	48
Grasa	1

Fuente: (Fajardo y Sarmiento, 2007).

2.2.7.2. Nutrición.

La levadura *S. cerevisiae* requiere de ciertos tipos de nutrientes y condiciones ambientales para su óptimo crecimiento, por ejemplo: carbono, hidrógeno, oxígeno, nitrógeno y fósforo (Fajardo y Sarmiento, 2007). En la Tabla 12 se muestran algunos de estos elementos necesarios para el crecimiento y reproducción óptima de esta levadura.

Tabla 33*Elementos básicos necesarios para el crecimiento de la levadura S. cerevisiae*

Elemento	Función
Carbono	Fuente de energía y material constructivo de la masa muscular, es decir como fuente de carbono, por ejemplo: la hexosa, glucosa, fructosa y manosa.
Nitrógeno	Forma parte esencial de los aminoácidos, dipéptidos, tripéptidos y ácidos nucleicos presentes en la célula.
Fósforo	Intervienen en el proceso de degradación oxidativa, intercambio energético, regula la síntesis de los lípidos y los carbohidratos, y mantienen la integridad de la pared celular. Forma parte de los ácidos nucleicos, la lecitina y diversos compuestos fosforilados. La concentración óptima es de 0,6 milimolar por gramos de células.
Azufre	La fuente de este elemento es el sulfato de amonio, el sulfito y el tiosulfato. Permite un crecimiento más rápido que los iones sulfatos.
Elementos traza	K, Mg, Ca, Zn, Fe, Mn, Cl. El K estimula la fermentación y la respiración. El Mg activa las enzimas glicolíticas, estimula la síntesis de ácidos grasos y regula el ATP.
Microelementos	La concentración óptima del Co, B, Cd, Cr, Cu, I, Mo, Ni, Va es de 0,1 – 100 micromolar. Otros como Hg, Ag, Ar, Ba, Li, Ni, Os, Pb, Se, Te, pueden inhibir el crecimiento de la levadura cuanto su concentración es mayor a 100 micromolar.

Fuente: Adaptado de Buitrago y Tenjo (2007).

2.2.7.3. Requerimientos físico – químicos.

El crecimiento y reproducción de la levadura *S. cerevisiae* se ve favorecida cuando los valores de pH se encuentran en ciertos rangos de valores (Tabla 13) (Fajardo y Sarmiento, 2007).

Tabla 36*Característica fisiológica de la levadura S. cerevisiae: pH*

pH	Valor
4,0 – 5,0	Valor óptimo que favorece el crecimiento celular, producción enzimática y utilización de glucosa.
3,0	Máxima producción enzimática.
Medio alcalino	No se desarrollan de manera eficiente.

Fuente: Adaptado de Fajardo y Sarmiento (2007).

2.2.7.4. Inhibidores de crecimiento.

Los principales elementos inhibidores son: plata (Ag), arsénico (As), bario (Ba), litio (Li), níquel (Ni), osmio (Os), plomo (Pb), selenio (Se) y telurio (Te). El fosfato de piridoxal y piridoxamina provocan la descarboxilación de los aminoácidos. Otros compuestos cuando no están en ciertas concentraciones actúan como inhibidores, entre estos están el

pantotenato de calcio el cual debe estar a una concentración de alrededor de 6,25 miligramos por litro, la tiamina debe estar alrededor de 5 miligramos por litro, para que no afecte el crecimiento de la levadura. La biotina en una concentración de 1 miligramo por litro para que no afecte a las reacciones anabólicas: carboxilación del piruvato, síntesis de las bases púricas y pirimídicas, de los nucleótidos y de los ácidos nucleicos, síntesis de las proteínas, de los polisacáridos y de los ácidos grasos (Guillermo y Macías, 2014).

2.2.7.5. Tolerancia al etanol.

La levadura *S. cerevisiae* son las más resistentes al etanol. El etanol es tóxico en concentraciones del 8% (p/v) al 18% (p/v). El ácido linoleico aumenta la tolerancia al etanol, el ácido oleico también ayuda a mejorar la tolerancia, pero en menor grado que la primera (Buitrago y Tenjo, 2007).

Según varios estudios el etanol inhibe el crecimiento de la levadura causando daño en su ADN y la inactivación de algunas enzimas como la hexoquinasa y la deshidrogenasa, pero cuando la levadura *S. cerevisiae* crece en presencia de etanol se incrementa la cantidad de ácidos grasos insaturados provocando la disminución de la toxicidad del etanol (Buitrago y Tenjo, 2007).

2.3. Fermentación Alcohólica

La fermentación alcohólica es un conjunto de reacciones que se dan bajo ciertas condiciones y mediante la intervención de ciertos microorganismos principalmente las levaduras (*S. cerevisiae*), cuya función es la transformación de hidratos de carbono presentes en el mosto, llevando a la generación de productos principalmente alcohol etílico, dióxido de carbono, y liberación de energía (Vázquez y Dacosta, 2007). La reacción de la conversión se representa con la Ecuación 3 de Gay – Lussac (Macías y Saavedra, 2017) :

Ecuación 3: Fermentación alcohólica



A nivel estequiométrico puede parecer una reacción simple, sin embargo, para convertir la glucosa en alcohol etílico y dióxido de carbono se requiere de una serie de transformaciones, en la cual participan 51 enzimas y 3 sistemas coenzimáticos (Vázquez y Dacosta, 2007). Las levaduras utilizan ciertas enzimas para transformar la glucosa en ácido pirúvico mediante la ruta metabólica de “Embden – Meyerhof”, que luego es descarboxilado por la enzima carboxilasa hasta dióxido de carbono y acetaldehído. Finalmente el acetaldehído es reducido por la enzima deshidrogenasa hasta obtener el alcohol etílico (Figura 11) (Macías y Saavedra, 2017).

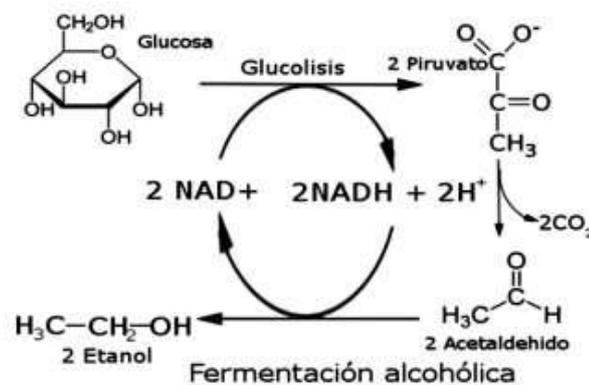


Figura 26. Transformación de la glucosa a etanol en fermentación alcohólica (vía de Embden – Meyerhof – Parnas).
Fuente: (Macías y Saavedra, 2017).

2.3.1. Condiciones para la fermentación alcohólica.

En la fermentación alcohólica es necesario tener un control sobre ciertos factores que pueden afectar la viabilidad y vitalidad de la población de levaduras. Los factores que afectan el desarrollo de la fermentación son: temperatura, pH, nutrientes, aireación, concentración de sustrato y presencia de alcohol. En la Tabla 14 se muestran ciertos rangos en donde se da un buen rendimiento al operar con la levadura *S. cerevisiae* que es la más utilizada.

Tabla 39*Condiciones de operación para procesos fermentativos según varios autores*

T ^a	cl ^b	pH	t ^c	Artículo
28	1,2	6	24	Demostraciones prácticas de los retos y oportunidades de la producción de bioetanol de primera y segunda generación a partir de cultivos tropicales (Zamora, Prado, Capataz, Barrera, y Peña, 2014).
24	0,5	-	30	Simulación del proceso de fermentación de cerveza artesanal (Garduño, López, Ruíz, y Martínez, 2014).
30	4	-	48	Producción de bioetanol por fermentación de hidrolizados hemicelulósicos de residuos de palma africana usando una cepa de <i>Scheffersomyces stipitis</i> adaptada (Herrera y Arias, 2014).
26	-	3,27	60	Impact of different cocoa hybrids (<i>Theobroma cacao L.</i>) and <i>S. cerevisiae</i> UFLA CA11 inoculation on microbial communities and volatile compounds of cocoa fermentation (Ramos, Rebeiro, Pedrozo, y Freitas, 2014).
37	-	4,97		
30	5	5	24	Fermentación de los fructanos del Agave tequilana. Weber Azul por <i>Zymomonas mobilis</i> y <i>Saccharomyces Cerevisiae</i> en la producción de bioetanol (Montañez, Victoria, Flores, y Vivar, 2011).
25	0,5	3,5	72	Evaluación de la fermentación alcohólica para la producción de hidromiel (Acosta, 2012).
30		4,2		
30	6	-	72	Kinetic models for batch and continuous ethanol fermentation from sweet sorghum juice by yeast immobilized on sweet sorghum stalks (Ariyajaroenwong, Laopaiboon, Salakkam, Srinophakun, y Laopaiboon, 2016).
30	1	-	72	Kinetic models for batch ethanol production from sweet sorghumjuice under normal and high gravity fermentations: Logistic andmodified Gompertz models (Phukoetphim, Salakkam, Laopaiboon, y Laopaiboon, 2017).

Fuente: Adaptado de Macías y Saavedra (2017).

^a Temperatura en grados centígrados. ^b Concentración inicial de levadura en gramos por litro.^c Tiempo de fermentación en horas.**2.3.1.1. Temperatura.**

La temperatura tiene un efecto muy notable en la fermentación, debido a que los microorganismos poseen un cierto rango de temperatura para su crecimiento. Las levaduras resisten temperaturas bajas en el cual permanecen en estado de inactividad o adormecidas. La mayoría actúan en un rango comprendido entre 5 – 37 grados centígrados, si son sometidas a temperaturas cercanas o mayores a los 52 grados centígrados se provoca la muerte de las mismas. El rango de temperatura óptimo para especialmente del género *S. cerevisiae* es de 25 – 35 grados centígrados. Si la

fermentación presenta temperaturas mayores a los 35 grados centígrados, el rendimiento disminuye ya que el nivel de estrés del microorganismo aumenta, provocando gran cantidad de azúcares residuales y que la fermentación se paralice; por lo que se debe evitar que el mosto fermente por encima de esta temperatura, enfriando lentamente ya que no resisten cambios bruscos de temperatura (Acosta, 2012).

2.3.1.2. pH.

Los microorganismos poseen un pH óptimo en el cual tienen mayor velocidad de crecimiento y rendimiento, por lo tanto, es importante tener un control sobre esta variable durante el desarrollo de la fermentación. Las levaduras en su gran mayoría son medianamente acidófilas, por lo cual su valor óptimo se encuentra en un rango de 4,0 a 6,5. Si se da un cambio en el valor de pH durante la fermentación, puede afectar la composición de las levaduras, afectando la floculación de la biomasa o la adhesión a las paredes (Fermentis, s.f.).

2.3.1.3. Nutrientes.

Durante la fermentación alcohólica, la levadura requiere de nutrientes para su crecimiento en las condiciones y concentraciones adecuadas, es por ello que se debe controlar la disponibilidad de nutrientes ya que puede ocasionar efectos negativos, siendo el más común la inhibición del crecimiento y paralización de la fermentación (Fermentis, s.f.).

2.3.1.4. Aireación.

Las fermentaciones alcohólicas se desarrollan en un ambiente anaeróbico, sin embargo, la adición de oxígeno se realiza con el fin de mejorar la síntesis de biomasa y aumentar la velocidad de fermentación. El empleo de este elemento se lo realiza al final de la fase de crecimiento, donde hay un mejor aprovechamiento de las levaduras, si se adiciona al inicio de la fermentación se puede afectar al producto, debido a procesos oxidativos (Acosta, 2012).

2.3.1.5. Concentración de Sustrato.

Es importante controlar las concentraciones de azúcares para la fermentación, ya que altas concentraciones provocan que se eleve la presión osmótica sobre las levaduras lo que

impide que no actúen sobre los mismos, mientras que concentraciones bajas el grado alcohólico será bajo. El rango óptimo está entre 10 – 18% (Garzón y Hernandez, 2009).

2.3.1.6. Concentración de etanol.

Durante la fermentación alcohólica la concentración de alcohol puede ocasionar la inhibición del crecimiento de las levaduras, incluso cuando está presente en concentraciones bajas. Esto se debe a que afecta la fisiología de la levadura principalmente la membrana celular ya que se incrementa la fluidez de la misma y afecta su integridad. Algunas cepas de *S. cerevisiae* pueden resistir hasta no más de 8 % (p/v), algunas industrias trabajan con cepas que resisten concentraciones de hasta 18 % (p/v), también se ha registrado hasta 21 % (p/v) pero en determinadas condiciones (Fermentis, s.f.).

2.3.2. Sistemas de Fermentación.

Los sistemas de fermentación corresponden al espacio físico (biorreactor) en donde se lleva a cabo las reacciones de degradación biológica anaerobia de materia orgánica mediante la acción de ciertos microorganismos como son algunas bacterias y levaduras. Los sistemas de fermentación se clasifican en base a su alimentación, entre los principales están el discontinuo y continuo (Sánchez, 2011).

2.3.2.1. Sistema de fermentación discontinuo.

En este tipo de sistema para iniciar la fermentación se añade al biorreactor el sustrato y el microorganismo a inocular, esta combinación producirá un determinado producto de interés. Luego de finalizado este proceso, se vacía el contenido del biorreactor, se le da una limpieza y esterilización para repetir nuevamente el proceso de fermentación (Sánchez, 2011; Mora, 2014).

En la Tabla 15 se muestran las principales ventajas y desventajas de utilizar este tipo de sistema.

Tabla 42*Ventajas y desventajas de la fermentación discontinua*

Ventajas	Desventajas
<ul style="list-style-type: none"> ▪ Bajo riesgo de contaminación. ▪ Flexibilidad operacional. ▪ Bajos costos de operación. 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Tiempos muertos al preparar el biorreactor para el siguiente lote. ▪ Requiere mucha mano de obra. ▪ Requiere mayor cuidado por parte de los operarios. ▪ El control y optimización del proceso pueden volverse complejos.

Fuente: Adaptado de Sánchez (2011); Chávez (2006).

2.3.2.2. Sistema de fermentación continuo.

El funcionamiento de este sistema de fermentación es similar al discontinuo, se debe añadir al biorreactor el sustrato y los microorganismos; una vez que se inocula se añade al biorreactor un flujo continuo de alimentación que contiene nutrientes del sustrato, además presenta un flujo de salida que contiene los productos de la fermentación. En este tipo de sistemas el flujo de entrada es igual al flujo de salida. El volumen de operación y las concentraciones de microorganismos, de sustrato y de producto permanecen constantes durante la fermentación (Sánchez, 2011; Paz, 2010).

En la Tabla 16 se muestran las ventajas y desventajas de utilizar este tipo de sistema.

Tabla 45*Ventajas y desventajas de la fermentación continua*

Ventajas	Desventajas
<ul style="list-style-type: none"> ▪ El crecimiento de los microorganismos se da a una velocidad constante. ▪ Se alcanza una población microbiana que mantiene un estado de máxima productividad. 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Contaminación en la alimentación continua. ▪ Mutaciones de los microorganismos. ▪ Costos de inversión y operación elevados. ▪ No es flexible cuando se trata de fermentar diferentes productos.

Fuente: Adaptado de Sánchez (2011); Núñez (2013).

2.4. Modelo de Monod

La curva de crecimiento puede expresarse en términos de los parámetros de producción cuando el desarrollo de un cultivo discontinuo solo está limitado por la cantidad inicial

de sustrato. La ecuación de Monod fue establecido en 1942 y describe la relación entre la velocidad específica de crecimiento, μ , y la concentración de nutriente limitante, S , en un cultivo microbiano (Quintero, 1981).

En la fase de crecimiento exponencial, los microorganismos aumentan de tamaño hasta alcanzar un tamaño al cual se dividen, originando dos nuevos microorganismos que, a su vez, crecen y se dividen de nuevo, es decir existe un aumento de biomasa, dX , que en un intervalo de tiempo infinitamente pequeño, dt , es proporcional a la cantidad de biomasa, X , que existe en el sistema (Macías y Saavedra, 2017).

Ecuación 4: Modelo de crecimiento celular de Monod

$$\frac{dX}{dt} = uX$$

$$\int_{X_0}^{X_L} \frac{dX}{dt} = \int_{t_0}^{t_L} u \cdot dt$$

$$\mu = \frac{\ln X_L - \ln X_0}{t_L - t_0}$$

La Ecuación 4 puede expresarse gráficamente, como se muestra a continuación:

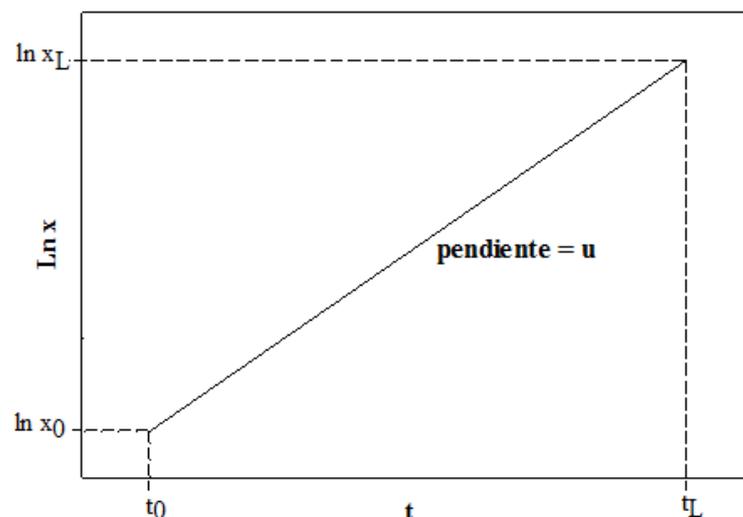


Figura 29. Fase exponencial de crecimiento microbiano.

Fuente: Adaptado de Hernández (1974); García (2012).



2.5. Modelo logístico

La modelación matemática tiene un fuerte uso en el estudio de la relación de distintas ciencias, como son: biología, química, física y matemáticas; predecir o tomar decisiones respecto a fenómenos sociales o naturales ya que, con la aplicación de una correcta interpretación de los mismos, ayuda en un futuro a obtener buenos resultados y además evita tener grandes pérdidas (Ulloa y Rodríguez, 2010).

Hoy en día la modelación matemática tiene un amplio y variado campo de aplicaciones como, por ejemplo, en plagas y enfermedades de los cultivos. Sin embargo, se la suele utilizar con mayor frecuencia para describir el crecimiento microbiano de distintos sistemas biológicos (Phukoetphim, et al., 2017; Ulloa y Rodríguez, 2010).

Una de las formas más simples de describir el crecimiento en las poblaciones naturales es el modelo logístico propuesto en 1838 por Pierre Francois Verhulst (Phukoetphim, et al., 2017) y se la representa con una curva sigmoidea o en forma de S (Ulloa y Rodríguez, 2010).

Este modelo se emplea para describir lo siguiente (Ulloa y Rodríguez, 2010):

- El crecimiento microbiano sin incluir el consumo de sustrato como lo haría un modelo basado en la ecuación de Monod (Dodić et al., 2012).
- Las ventas de un producto cuando se tiene un límite de total de ventas.
- El tiempo de respuesta de los pacientes a los medicamentos.
- La población total de la fauna en una isla.
- El número de bacterias en una caja Petri.

En el crecimiento microbiano el modelo logístico describe los cambios en la cantidad de organismos que se da desde la concentración inicial de biomasa hasta la concentración máxima del mismo; sin embargo, este modelo no tiene en consideración la inhibición del sustrato. El modelo describe la relación de la biomasa (X) con la concentración inicial de células (X_i), la concentración máxima de células (X_{max}) y la tasa de crecimiento específico máximo (μ_{max}) en momentos específicos (t) (Phukoetphim, et al., 2017).

A continuación, se exponen la ecuación logística diferencial y la ecuación logística integrada (Phukoetphim, et al., 2017).

Ecuación 5: Ecuación logística diferencial

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

Ecuación 6: Ecuación logística integrada

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

La Ecuación 6 puede representar tanto una fase exponencial como una fase estacionaria, sin embargo, no considera la fase de latencia ni predice la muerte (fase de declive) de los microorganismos después de la fase estacionaria (Dodić, et al., 2012).

2.5.1. Ejemplo de crecimiento logístico.

Cuando se cultiva en un tubo de ensayo la levadura usada para hacer pan y bebidas alcohólicas, se produce la curva sigmoidea o en forma de S. En la Figura 13 se puede observar el comportamiento del crecimiento de la levadura; primeramente, el crecimiento de la levadura es casi exponencial hasta que estabiliza cuando el contenido de nutrientes disponibles se ha agotado, es decir que las células de las levaduras se vuelven tan numerosas que sus productos comienzan a interferir con el propio crecimiento. En este caso en particular si se esperara que transcurriera más tiempo probablemente el tubo de ensayo colapsaría debido a que en un ambiente cerrado los desechos producidos por el agotamiento de los recursos alcanzan niveles tóxicos (Ecological Economics Program [EEP], 2001; OpenStax, s.f.).

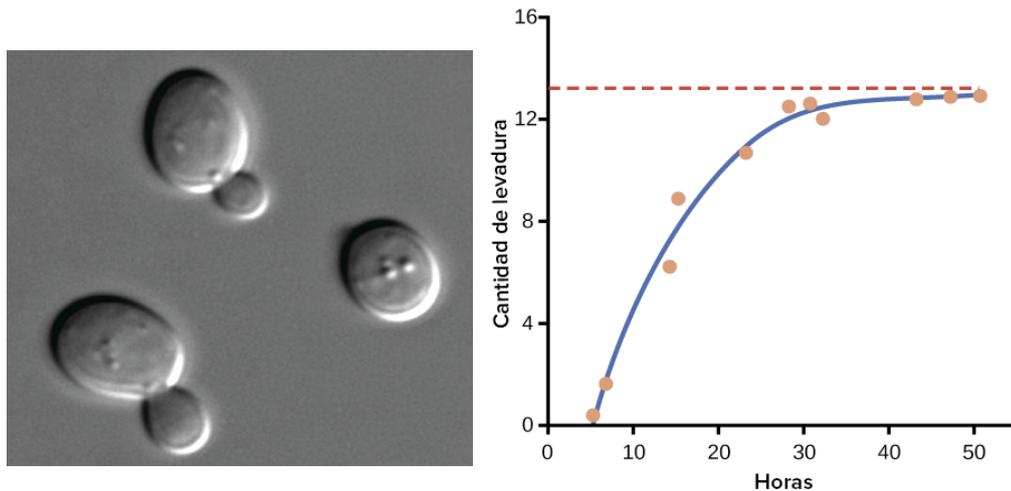


Figura 32. Curva de crecimiento logístico en forma de S de la levadura cultivada en condiciones ideales en un tubo de ensayo.

Fuente: (OpenStax, s.f.).

2.6. Modelo de Gompertz modificado

El Modelo de Gompertz fue desarrollado originalmente para ajustar datos de mortalidad humana, luego fue demostrado en curvas de inactivación microbiana y actualmente es utilizado para describir el crecimiento de microorganismos y la obtención de parámetros cinéticos, ya que relaciona el crecimiento exponencial con la tasa de crecimiento específico y la densidad de la población. Además, a partir de este modelo primario se pueden desarrollar modelos secundarios (Albornoz, 2015; Castro, et al., 2008; Cayré, Vignolo, y Garro, 2007).

El modelo de Gompertz modificado es comúnmente empleado para describir la producción de etanol durante la fermentación, que proporciona el tiempo de retraso (t_l), la tasa máxima de producción de etanol ($r_{p,m}$) y la máxima concentración de etanol para la fermentación de etanol ($P_{p,max}$) (Dodić, et al., 2012).

Ecuación 7: Ecuación de Gompertz modificado

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

Este modelo se puede modificar adicionando la concentración celular inicial (X_i) para describir la producción de biomasa (X) durante la fermentación de etanol, además puede ser usado para estimar el tiempo de retraso (t_l) y la tasa máxima producción de biomasa (r_m) (Phukoetphim, et al., 2017).

Ecuación 8: Ecuación de Gompertz modificado para el crecimiento de biomasa

$$X = X_i + \left\{ X_{max} \cdot \exp \left\{ -\exp \left[\frac{r_m \cdot \exp(1)}{X_{max}} \cdot (t_L - t) + 1 \right] \right\} \right\}$$

2.7. Modelo de Andrew y Levenspiel

El Modelo de Andrew y Levenspiel es un modelo cinético propuesto para representar la tasa de crecimiento específico (μ) teniendo en cuenta el fenómeno de la inhibición mixta (inhibición por sustrato y por producto). El modelo de Andrew fue propuesta en 1968 y tiene en cuenta un término de inhibición por sustrato (K_{IS}) en un cultivo en un reactor de mezcla completa; mientras que el modelo de Levenspiel fue propuesta en 1980 y considera el fenómeno de inhibición por producto (α) (Instituto Cubano de Investigaciones de los Derivados de la Caña de Azúcar [ICIDCA], 2007; Ribas y Díaz, 2004).

A continuación, se expone la ecuación del modelo de Andrew y Levenspiel (Ariyajaroenwong, et al., 2016).

Ecuación 9: Modelo de Andrew y Levenspiel.

$$\mu = \left(\frac{\mu_{max} S}{K_S + S + \frac{S^2}{K_{IS}}} \right) \left(1 - \frac{P_E}{P_{X,max}} \right)^\alpha$$

3. METODOLOGÍA

El presente estudio es de carácter experimental – explorativo, basado en la fermentación discontinua con mucílago de cacao CCN – 51 en un biorreactor homogéneo de tanque agitado bajo diferentes condiciones de temperatura, pH y concentración de levadura *S. cerevisiae* con la finalidad de encontrar la mayor concentración de biomasa y su posterior modelo cinético a través de la ecuación logística integrada y el modelo de Andrew y Levenspiel.

La parte experimental de este trabajo de titulación se realizó en las instalaciones del Tecnológico de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad de Cuenca: Laboratorio de Tecnología de Conservas Vegetales donde se realizó la extracción del mucílago de cacao; y Laboratorio de Energía e Ingeniería de la Reacción, donde se efectuaron los procesos de fermentación y método analítico peso seco.

3.1. Materia Prima

3.1.1. Mucílago de cacao CCN – 51.

El cacao CCN – 51 es una especie clonada de origen ecuatoriano (ANECACAO, 2015), del cual se extrajo el mucílago para este estudio. La recolección de las mazorcas se realizó en la zona 6 del Ecuador, específicamente en una finca ubicada en el cantón La Troncal, cuyo punto de georreferencia es: 2°29'25''S y 79°19'3''O (Macías y Saavedra, 2017).

El lugar se escogió debido a que por un estudio previo ya existía la caracterización de la muestra (“*Caracterización del mucílago de cacao CCN – 51 mediante espectrofotometría UV-visible y absorción atómica*”, (Quizhpi, 2016), además de que esta zona queda a tan solo 2 horas y 30 minutos de la Universidad de Cuenca, así como la accesibilidad para la recolección.

Esta variedad de cacao fue seleccionada por su alta productividad y calidad, tolerancia a las enfermedades, sus pepas por mazorca son mayores a 50 unidades y adaptadas a una demanda industrial (pepas homogéneas), facilidad de cosecha y un rendimiento de 20

hasta 60 quintales por hectárea, además de que la primera cosecha se puede realizar desde los dos años (Pigache y Bainville, 2005).

3.1.2. Levadura.

Se empleó levadura fresca del tipo *S. cerevisiae* de la marca Levapan, la cual es usada comúnmente para la panificación (Macías y Saavedra, 2017).

La levadura de la marca Levapan es un producto orgánico y biológico que garantiza la mejor actividad en la fermentación. La vida útil de este producto es de 30 días en condiciones óptimas de almacenamiento: 2 – 5 grados centígrados. Se la puede adquirir en dos tipos de presentación: en bloque de 500 gramos empacado en caja corrugada de 50 unidades y en bulto levadura fresca de 16 kilogramos (granel) (Levapan, 2017), para este estudio se adquirió la presentación en granel, la misma que fue adquirida en la cadena Supermaxi Las Américas.

3.2. Materiales, equipos y reactivos

Los materiales, equipos y reactivos químicos utilizados para cada etapa de la fase experimental fueron los siguientes:

3.2.1. Material de laboratorio y otros.

- Algodón hidrófilo.
- Balones de aforo.
- Bandejas de aluminio para cocina.
- Cronómetro.
- Desecador.
- Embudo de vidrio.
- Embudos plásticos.
- Espátula de acero inoxidable.
- Gradillas.
- Material de acero.
- Material de protección.
- Ollas de acero inoxidable UMCO.
- Piceta.
- Pipeta volumétrica.
- Probetas, diferentes capacidades.
- Tubos de ensayo, base plana.
- Termómetro de varilla, marca Brand (-10 – 50°C), UK.



- Varillas de agitación.
- Vasos de precipitación, diferentes capacidades.
- Utensilios de cocina de acero inoxidable.

3.2.2. Equipos.

- Balanza analítica, marca Mettler Toledo ME204, máximo 220g, d = 0,0001g, USA.
- Biorreactor, marca Biotron GX Single vessel.
- Cocina Industrial, marca Sumbita.
- Esterilizador, marca Memmert SN75, 5 – 250°C, DE.
- Fluidificador.
- Amasadora y Mezcladora, máximo 40Kg.
- pH – metro, marca HANNA® instruments HI11310, 0 a 13ph, -5 a 100°C, EU.
- Refractómetro portable, marca Cole-Parmer®, 0 – 32 Brix.
- Refrigerador Side by Side con dispensador, marca INDURAMA RI – 785.

3.2.3. Reactivos químicos.

- Ácido clorhídrico 1N.
- Agua Destilada.
- Hidróxido de sodio 1N.

3.3. Métodos

3.3.1. Extracción del mucílago de cacao CCN – 51.

La extracción y obtención del mucílago de cacao se realizó como se muestra en la Figura 14.

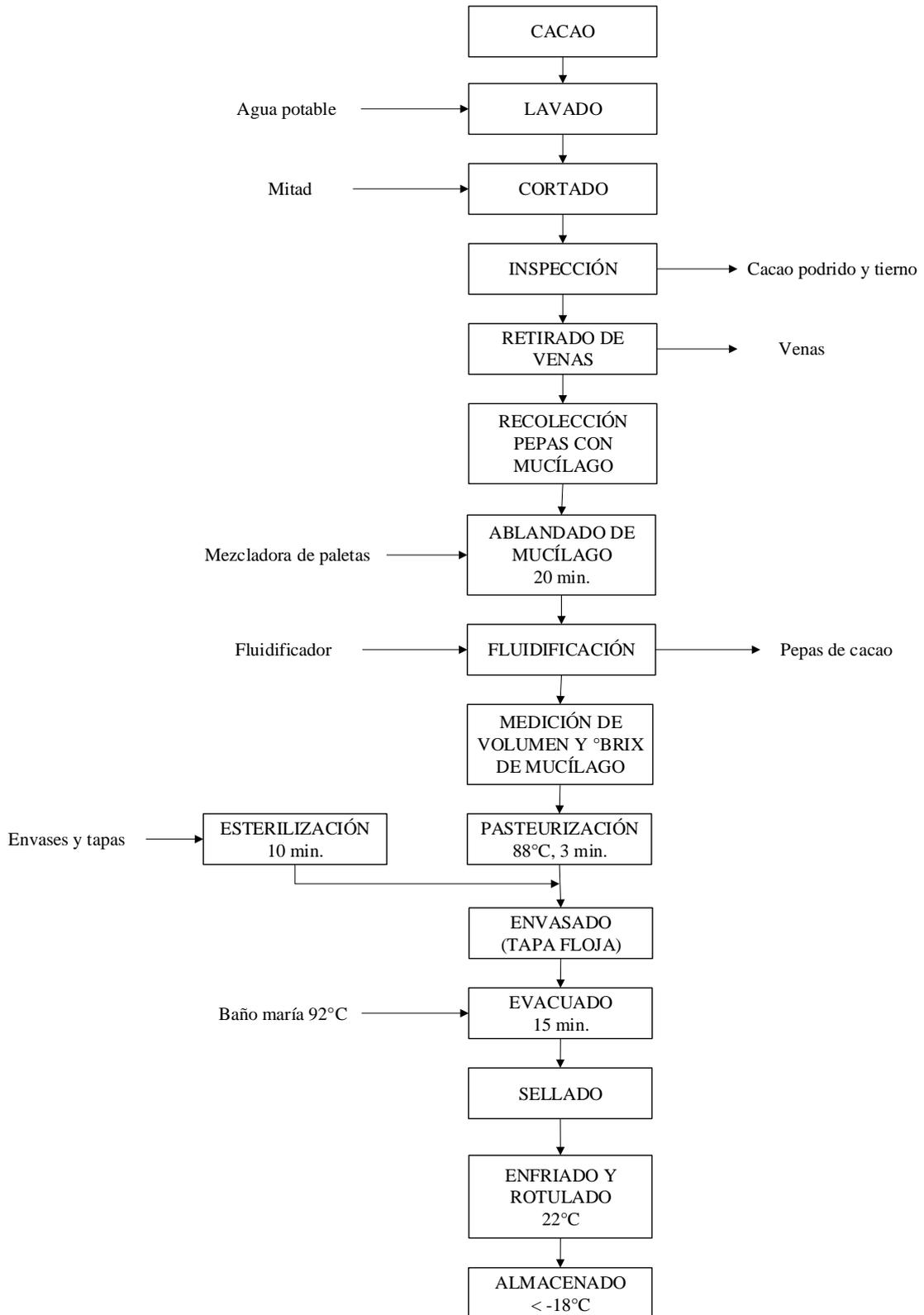


Figura 35. Diagrama de Flujo para la extracción del mucílago de cacao CCN – 51.
 Fuente: Adaptado de Macías y Saavedra (2017).

3.3.2. Matriz de diseño experimental.

La matriz de diseño experimental que se utilizó en este estudio corresponde a otra investigación: “*Determinación de la cinética de fermentación alcohólica del mucílago de cacao CCN-51 en condiciones óptimas de operación de temperatura, pH y concentración de levadura*” (Macías y Saavedra, 2017).

El diseño experimental que se empleó fue el factorial completo 2^3 de dos niveles un máximo y un mínimo, mientras que las variables consideradas fueron temperatura, pH y concentración de levadura *S. cerevisiae*; las mismas que se muestran en la Tabla 17.

Tabla 48
Variables y niveles para el diseño experimental

Factor	Variable	Valor	
		mínimo (-)	máximo (+)
Temperatura, (°C)	X ₁	25	35
pH	X ₂	4	5
Concentración de levadura, (g/L)	X ₃	1	3

Fuente: (Macías y Saavedra, 2017).

En la Tabla 18 se muestra la matriz de diseño experimental que se empleó en este estudio. Se realizaron diez experimentos, de los cuales dos corresponden a los valores centrales del dominio experimental con el propósito de verificar los resultados obtenidos.

Tabla 51
Matriz de diseño factorial completo 2^3

Experimento	X ₁ ^a	X ₂ ^b	X ₃ ^c
1	-	-	-
2	+	-	-
3	-	+	-
4	+	+	-
5	-	-	+
6	+	-	+
7	-	+	+
8	+	+	+
9*	0	0	0
9*	0	0	0

Fuente: (Macías y Saavedra, 2017).

* Valores centrales del dominio experimental. ^a Temperatura (°C). ^b pH. ^c Concentración de Levadura (g/L).



Se siguió un orden aleatorio para realizar los experimentos de la matriz, con la finalidad de evitar que el efecto de un factor esté confundido con el de otro factor no intencionado y se introduzca sesgo en los valores de los resultados (Ferré, s.f.).

La variable de salida que se analizó fue la concentración de biomasa (g/L) durante la fermentación discontinua de etanol con mucílago, la misma que se determinó mediante el método analítico peso seco.

3.3.2.1. Determinación de los efectos de las variables.

Los efectos de las variables son coeficientes que se obtienen de la ecuación polinomial del diseño experimental. Estos valores se obtuvieron usando el en el software Statgraphics® Centurion XVI. II., que da directamente los resultados correspondientes a la parte estadística del T-student ANOVA.

3.3.3. Fermentación discontinua de etanol.

Se llevó a cabo la fermentación discontinua de etanol a partir de mucílago de cacao CCN – 51 utilizando la levadura *S. cerevisiae*, con la cantidad de sustrato que naturalmente posee este residuo, además se realizó de acuerdo a las condiciones de operación de temperatura, pH y concentración de levadura descritas en la matriz de diseño experimental (Tabla 18).

Este proceso se llevó a cabo en un biorreactor homogéneo de tanque agitado en el mismo que se estableció las condiciones de trabajo: temperatura, pH y agitación. La cantidad de mucílago con la que se trabajó fue de 2 litros ya que el biorreactor (fermentador) Biotron GX Single vessel tiene una capacidad de 2,5 litros. Se realizaron pre – experimentos para determinar el tiempo de fermentación (horas) y la velocidad de agitación (rpm).

Al realizar los pre – experimentos se pudo observar que cada ensayo alcanzaba el estado estacionario en diferentes tiempos, ya que el mismo dependía de las condiciones de operación, razón por la cual no se estableció un tiempo de fermentación estándar para dar por terminado cada experimento. Durante este proceso se realizaron mediciones de los



grados Brix, el mismo que fue disminuyendo a medida que la concentración de biomasa aumentaba, pero llegaba a un punto en el que dichos grados ya no disminuían, es decir se mantenían constantes a lo largo del tiempo, así como la concentración de biomasa, esto se pudo comprobar con un pre – experimento realizado durante 336 horas (14 días), por lo que se concluyó que a grados Brix constantes se tiene concentración de biomasa constante, alcanzando así el estado estacionario, con base en esta conclusión se estableció que una vez que se tiene tres puntos con iguales grados se da por finalizada la fermentación alcohólica. El promedio de la concentración final de biomasa se realizó con los valores del estado estacionario, es decir con los tres últimos datos de muestreo.

Para fermentadores que tienen la capacidad entre cero y tres litros se recomienda utilizar una velocidad de agitación de 200 – 2000 rpm para que la materia prima se mantenga homogénea a lo largo del tiempo de fermentación sin presentar generación de espuma (Quintero, 1981). Inicialmente se trabajó con 350 rpm (Macías y Saavedra, 2017), con el cual se presentaron problemas por la cantidad de espuma generada afectando la oxigenación a lo largo de la fermentación, ya que la generación de espuma es un interferente en el crecimiento microbiano por influir en la condiciones aerobias del proceso (Nahvi, Emtiazi, y Alkabi, 2002), razón por la cual se decidió disminuir la velocidad de agitación resultando ser 250 rpm la mejor opción.

Durante la fermentación alcohólica se llevó a cabo el método analítico peso seco, además es importante mencionar que durante las primeras 24 horas de fermentación se realizó un control riguroso de las condiciones de operación (pH, temperatura, grados brix y flujo de nitrógeno) pasado este tiempo se tuvo menos control ya que no se observó mayor variación de las mismas con los pre – experimentos realizados.

Para mantener constante el pH durante la fermentación se utilizó hidróxido de sodio 1N, ya que la materia prima presenta un pH bajo (aproximadamente 3,87), además de que en procesos de fermentación este parámetro tiende a bajar, son por estas razones que se requiere una base fuerte (Acosta, 2012; Vallejo, et al., 2016).

3.3.3.1. Diagrama de Flujo.

La fermentación discontinua de etanol del mucílago se realizó como se muestra en la Figura 15.

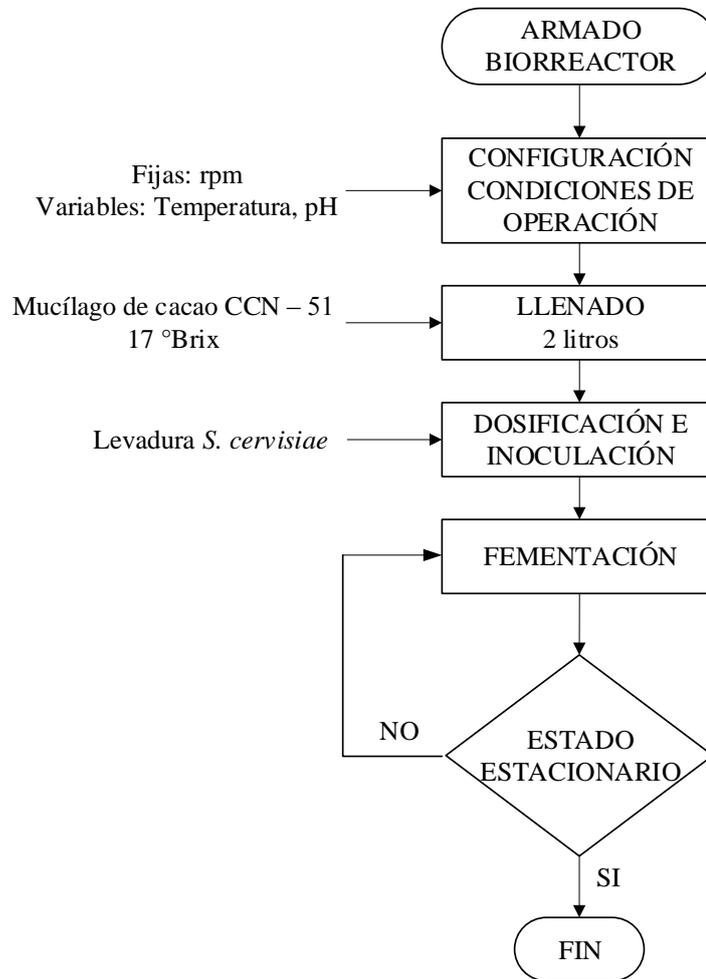


Figura 38. Diagrama de Flujo para la fermentación discontinua de etanol.

Fuente: Adaptado de Macías y Saavedra (2017).

3.3.4. Método analítico peso seco.

El método analítico peso seco es adecuado para una variedad de aplicaciones (Dumont, Velde, y Dumont, 1975), a pesar de que probablemente no sea la única ni la mejor de las estimaciones posibles, sin embargo este método fue seleccionado para este estudio debido a su versatilidad y facilidad de trabajo.

Este método consistió en la toma de muestras cada 6 horas por triplicado durante las 30 primeras horas, ya que durante los pre – experimentos se observó que en el transcurso de este tiempo es donde mayor control se debe realizar a la fermentación alcohólica.

Pasadas las 30 horas se procedió a tomar muestras por triplicado por rangos de aproximadamente 12 horas hasta alcanzar el estado estacionario. Se tomó una muestra inicial (blanco) sin inocular y con las condiciones de operación: temperatura y pH ajustados a cada experimento, para eliminar el peso de materia orgánica del mucílago fermentado y así obtener el peso de biomasa en cada tiempo de muestreo.

Las fórmulas que se emplearon para determinar el peso de biomasa fueron las siguientes (Camacho y Torres, 2009):

Ecuación 10: Peso muestra seca

$$\text{Peso muestra seca} \left(\frac{g}{ml} \right) = \frac{(\text{Peso Tubo} + \text{muestra seca}) - \text{Peso tubo vacío}}{\text{Volumen de muestra} (= 5ml)}$$

Ecuación 11: Peso biomasa

$$\text{Peso biomasa} \left(\frac{g}{ml} \right) = \text{Peso blanco} - \text{Peso muestra seca}$$

Los datos de los pesos se registraron en la Hoja de Cálculo de Microsoft Excel; posteriormente se efectuó el análisis de los resultados obtenidos determinando el porcentaje de error, empleando la Ecuación 12 (Aubanell, Benseny, y Delshams, 1993), si el porcentaje de error superaba al 5 % (Hernández, Fernández, y Baptista, 2014) no se utilizaba el dato para realizar las curvas de crecimiento de biomasa correspondientes a cada experimento. Las gráficas fueron realizadas en el software SigmaPlot 12.0.

Ecuación 12: Porcentaje de error experimental

$$\% \text{ Error} = \frac{\text{Valor real} - \text{Valor aproximado}}{\text{Valor real}} * 100$$

En la Ecuación 12 se tomó como valor real o valor probable la media aritmética simple de los resultados o promedio de las mediciones, es decir el promedio con los tres valores de pesos secos para cada periodo de muestreo (Arriagada y Peralta, 2008).

3.3.4.1. Diagrama de Flujo.

El método analítico peso seco se realizó como se muestra en la Figura 16.

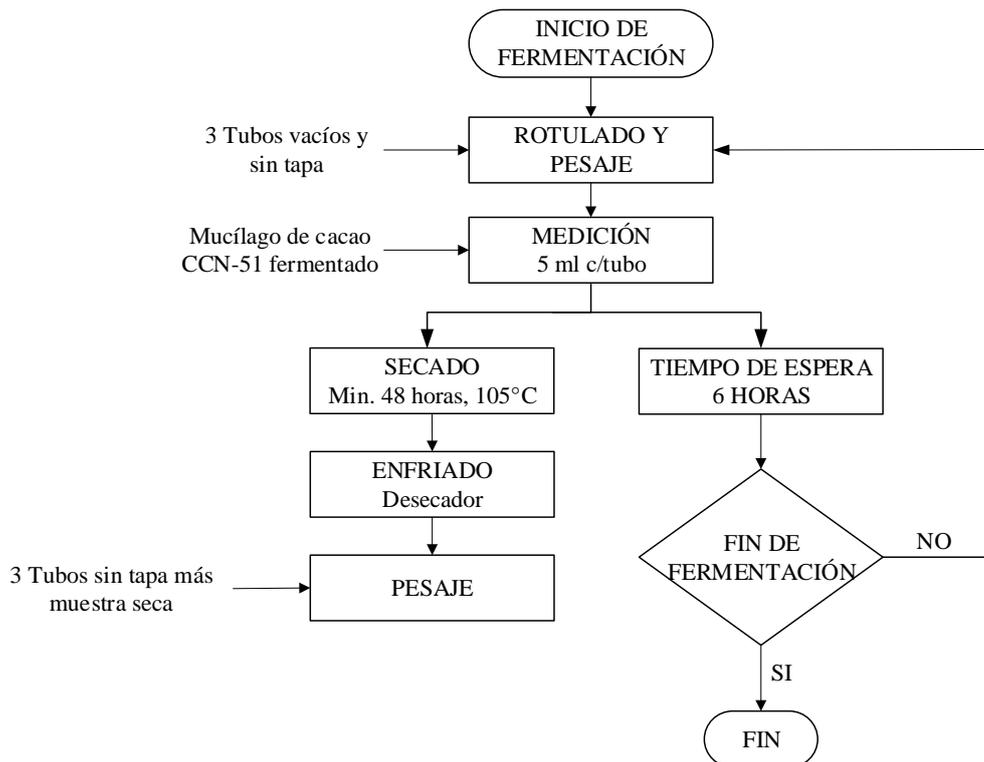


Figura 41. Diagrama de Flujo para el método analítico peso seco.

3.3.4.2. Determinación de los parámetros óptimos de operación.

Los parámetros óptimos de temperatura, pH y concentración de levadura se determinaron analizando los resultados de la concentración final de biomasa con su respectivo tiempo de fermentación, conjuntamente con la concentración final de alcohol obtenida de un estudio paralelo a este, realizado en la Universidad de Cuenca: “*Modelado de la ecuación de Gompertz modificado para la producción de bioetanol en procesos fermentativos dentro de un reactor tipo batch a partir de mucílago de cacao CCN– 51. Caso: Ecuador – Zona 6*”.



3.3.5. Modelo de Monod.

La tasa de crecimiento específico (μ) de la biomasa durante la fermentación discontinua de etanol se determinó aplicando la ley de Monod (Ecuación 4), evaluando la curva de crecimiento correspondiente a las condiciones óptimas de operación, obteniéndose así la velocidad análoga a la pendiente de la fase de crecimiento exponencial.

3.3.6. Modelo logístico.

La ecuación logística integrada (Ecuación 6) se utilizó para modelar el proceso de fermentación y determinar la tasa de crecimiento específico máximo (μ_{max}) ajustando los datos experimentales correspondientes a las condiciones óptimas de operación. Este ajuste se realizó empleando el método de mínimos cuadrados no lineales de Marquardt en MATLAB (Versión 8.3) y el coeficiente de determinación (R^2) se obtuvo del mismo software.

3.3.7. Modelo de Gompertz modificado.

La ecuación de Gompertz modificado se utilizó para modelar el proceso de fermentación, y determinar el tiempo de retraso (t_l) ajustando los datos experimentales correspondientes a las condiciones óptimas de operación. Este ajuste se realizó empleando el método de mínimos cuadrados no lineales de Marquardt en MATLAB (Versión 8.3) y el coeficiente de determinación (R^2) se obtuvo del mismo software.

La tasa de producción de biomasa se calculó aplicando la ecuación de la velocidad media o velocidad promedio, la misma que representa la velocidad en un intervalo de tiempo dado (Vrancken y Engler, 2014).

Ecuación 13: Tasa de producción de biomasa

$$v_m = \frac{\Delta r}{\Delta t} = \frac{r_2 - r_1}{t_2 - t_1}$$

3.3.8. Modelo de Andrew y Levenspiel.

El modelo de Andrew y Levenspiel se utilizó para determinar diferentes parámetros cinéticos ($P_{X.max}$, K_{SP} , K_{IS} , K_{IP} , m , q_{max} , α , β , $Y_{X/S}$, $Y_{P/S}$, μ_{max} , K_S) ajustando los datos experimentales correspondientes a las condiciones óptimas de operación.

Las ecuaciones diferenciales que se utilizaron para describir la tasa de crecimiento de biomasa y formación de producto fueron las siguientes (Ariyajaroenwong, et al., 2016):

Ecuación 14: Ecuación diferencial de la tasa de crecimiento de biomasa

$$\frac{dX}{dt} = X \left(\frac{\mu_{max} S}{K_S + S + \frac{S^2}{K_{IS}}} \right) \left(1 - \frac{P_E}{P_{X.max}} \right)^\alpha$$

Ecuación 15: Ecuación diferencial de la formación de etanol

$$\frac{dP_E}{dt} = X \left(\frac{q_{max} S}{K_{SP} + S + \frac{S^2}{K_{IP}}} \right) \left(1 - \frac{P_E}{P_{P.max}} \right)^\beta$$

En la fermentación discontinua de etanol, el sustrato se utiliza para el crecimiento y mantenimiento celular, así como para la producción de etanol. La ecuación del consumo de sustrato que se empleó fue la siguiente (Ariyajaroenwong, et al., 2016):

Ecuación 16: Ecuación diferencial del consumo de glucosa

$$-\frac{dS}{dt} = \frac{1}{Y_{X/S}} \left(\frac{dX}{dt} \right) + \frac{1}{Y_{P/S}} \left(\frac{dP_E}{dt} \right) + mX$$

Los parámetros cinéticos se determinaron utilizando el método de mínimos cuadrados no lineales de Marquardt. La integración numérica simultánea de las ecuaciones del modelo se realizó empleando la rutina ODE23 de MATLAB (Versión 8.3). La exactitud de los modelos se evaluó en función de sus coeficientes de determinación (R^2). Los parámetros cinéticos $P_{P.max}$ y P_E (datos experimentales) se tomaron del estudio mencionado en el apartado 3.3.4.2.; mientras que los valores experimentales del consumo de glucosa a lo largo de la fermentación discontinua se obtuvieron de otro estudio (Macías y Saavedra, 2017).

4. ANÁLISIS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS

4.1. Optimización de las variables que intervienen en la producción de biomasa en procesos fermentativos

Para la optimización de las variables que intervienen en la producción de biomasa durante el proceso de fermentación alcohólica las condiciones de operación que se fijaron fueron: temperatura (X_1), pH (X_2) y concentración de levadura (X_3). La selección de estas variables se realizó debido a que son las más relevantes en procesos fermentativos tanto para el crecimiento de levaduras como para el control de las condiciones durante el proceso. La disponibilidad de nutrientes no fue considerada en este estudio, por la limitación de recursos; mientras que la concentración de etanol como producto fue considerada del estudio mencionado en el apartado 3.3.4.2., determinando así las condiciones óptimas de operación.

4.1.1. Método analítico peso seco.

4.1.1.1. Análisis de los resultados del Experimento 6.

En la Tabla 19 se muestran los resultados obtenidos en el experimento 6, así como sus respectivos porcentajes de error, los cuales fueron calculados empleando la Ecuación 12. Este análisis se realizó por igual para cada experimento, cuyos resultados están expuestos en el Anexo 2.

En el experimento 6 de la matriz experimental se eliminaron los resultados de los pesos secos de las muestras B (0,1121 g/mL a la hora 0,0) y A (0,0413 g/mL a la hora 21,5), con un error del 9,98% y 10,25%; respectivamente. Estos resultados no se consideraron para realizar el promedio respectivo ya que superaron el porcentaje de aceptación 5%. Las causas por las cuales estos dos resultados presentaron dichos porcentajes de error pudieron deberse a errores humanos, o pérdidas de la muestra ya que se observó una pequeña cantidad de la misma derramada fuera del tubo que la contenía. Todos los demás datos de pesos secos si fueron considerados para realizar el promedio (g/mL) y así realizar posteriores análisis.

Tabla 54

Resultados obtenidos a partir del método analítico peso seco con sus respectivos porcentajes de error. Experimento 6 de la matriz experimental

Tiempo [h]	Peso muestra seca [g/mL]			Porcentaje de error experimental [%]		
	A ⁺	B ⁺⁺	C ⁺⁺⁺	A ⁺	B ⁺⁺	C ⁺⁺⁺
0,0*	0,1312	0,1121	0,1303	5,34	9,98	4,64
0,0	0,1298	0,1305	0,1295	0,10	0,44	0,33
6,0	0,1140	0,1144	0,1141	0,16	0,19	0,02
12,0	0,0926	0,0924	0,0915	0,42	0,27	0,70
18,0	0,0718	0,0717	0,0717	0,13	0,08	0,05
21,5	0,0413	0,0610	0,0614	10,25	4,81	5,43
25,5	0,0509	0,0511	0,0509	0,10	0,20	0,10
30,0	0,0417	0,0428	0,0426	1,49	1,00	0,48
34,5	0,0389	0,0397	0,0395	1,28	0,94	0,33
48,0	0,0391	0,0397	0,0409	1,95	0,54	2,50
59,0	0,0394	0,0400	0,0404	1,35	0,15	1,20

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

*Los valores de la primera fila corresponden al Blanco (sin levadura *S. cerevisiae*). ⁺Primera muestra. ⁺⁺Segunda muestra. ⁺⁺⁺Tercera muestra.

En la Tabla 20 se muestran los resultados de los promedios de pesos de muestras secas (g/L), los pesos de biomasa (g/L) y los grados Brix para cada tiempo de muestreo obtenidos en el experimento 6; y en la Figura 17 se representa – Tiempo [h] vs. Concentración de Biomasa [g/L] – con los datos expuestos en la misma tabla, donde se puede evidenciar que todos los promedios siguieron una buena tendencia con respecto al crecimiento de levadura *S. cerevisiae*. Este ensayo finalizó a las 59 horas, no se observó la fase de adaptación debido al tiempo de muestreo y si lo hubo fue corto, ya que otro estudio reportó que esta fase transcurre aproximadamente en la primera hora de fermentación (Muñoz, 2013); el crecimiento de biomasa se dio exponencialmente aproximadamente a partir de las 0 horas, alcanzando el estado estacionario a la hora 34,5 con una concentración promedio de biomasa de 90,9880 g/L. Otro estudio reportó el tiempo en el que se estabilizó la fermentación (mayor consumo de sustrato) pasada la hora 32, en condiciones de operación de 33°C y pH de 4 (Leal, Tarantino, Hernández, y Morán, 2014).

Tabla 57

Concentración de biomasa a partir del método analítico peso seco.
Experimento 6 de la matriz experimental

Tiempo [h]	Promedio peso muestra seca [g/mL]	Promedio peso muestra seca [g/L]	Peso biomasa [g/L]	°Brix
0,0*	0,1307	130,7300	0,0000	17,0
0,0	0,1299	129,9333	0,7967	17,0
6,0	0,1142	114,1533	16,5767	15,0
12,0	0,0922	92,1667	38,5633	12,0
18,0	0,0717	71,7200	59,0100	10,0
21,5	0,0612	61,2200	69,5100	9,0
25,5	0,0510	50,9933	79,7367	7,5
30,0	0,0424	42,3533	88,3767	6,5
34,5	0,0399	39,9400	90,7900	6,0
48,0	0,0399	39,9193	90,8107	6,0
59,0	0,0394	39,3667	91,3633	6,0

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

*Los valores de la primera fila corresponden al Blanco (sin levadura *S. cerevisiae*).

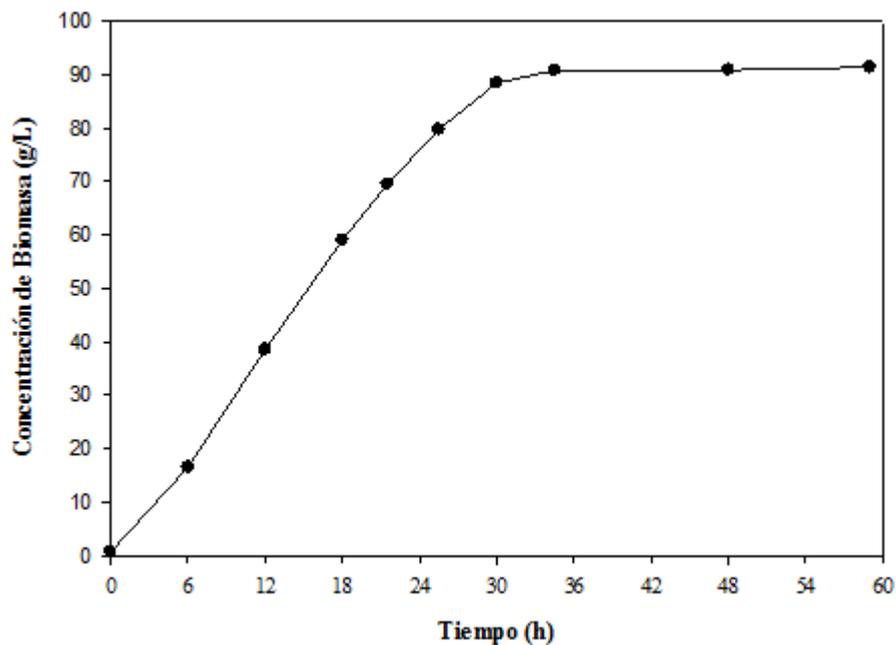


Figura 44. Concentración de biomasa en fermentación discontinua con las condiciones de operación de pH (4), temperatura (35°C) y concentración de levadura (3g/L) aplicando el método analítico de peso seco.

En ninguno de los experimentos realizados se pudo observar la fase de declive, debido a que este transcurre durante un tiempo tres o cuatro veces más largo que la de crecimiento (Hidalgo, 2010). En otro estudio realizado la fase de declive se alcanzó a las 500 horas (Raynal, et al., 2011), es así que en uno de los pre – experimentos de este estudio se llegó hasta las 336 horas y ni este tiempo fue suficiente para evidenciar dicha fase, este ensayo no se prolongó por más tiempo ya que el objetivo principal fue alcanzar la máxima concentración de biomasa, la misma que se obtuvo al llegar al estado estacionario.

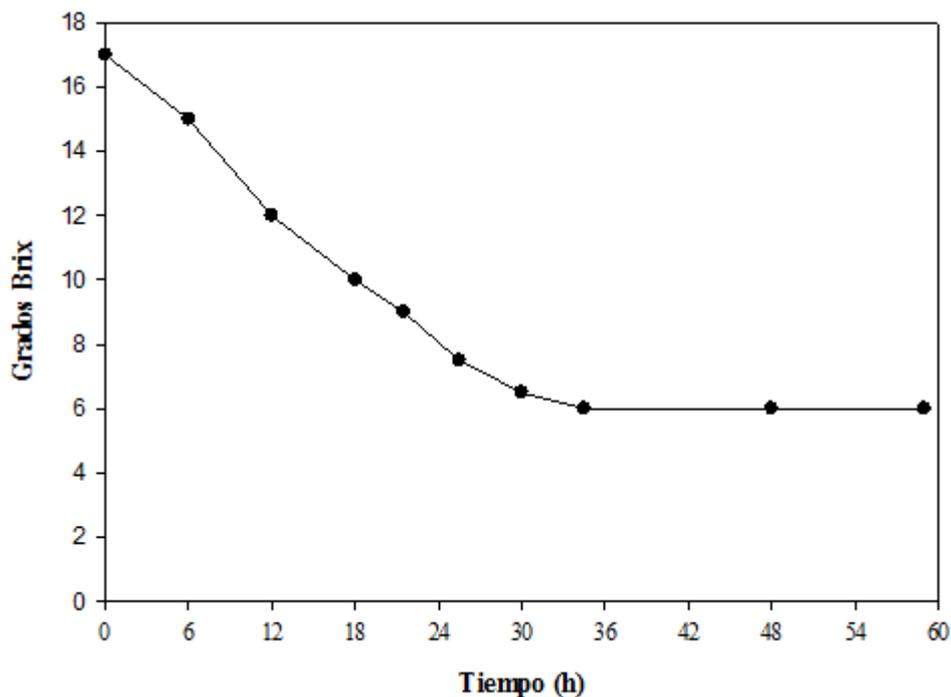


Figura 47. Variación de los grados Brix en fermentación discontinua con las condiciones de operación de pH (4), temperatura (35°C) y concentración de levadura (3g/L).

En la Figura 18 se representa – Tiempo [h] vs. Grados Brix – con los datos expuestos en la Tabla 20, donde se observa el comportamiento exponencial en la reducción de los grados Brix desde la hora 0 hasta la hora 30, la reducción ocurre debido a la presencia de la enzima invertasa que hace que la levadura consuma sustrato a medida que actúa sobre la sacarosa produciendo azúcares reductores (glucosa y fructuosa), los cuales son más simples y la levadura puede asimilarlos con mayor facilidad; el estado estacionario se observó a partir de la hora 34,5 con un valor de 6,0 grados Brix, siendo constante este

valor a través del tiempo, indicando que el proceso ya terminó, esto probablemente ocurre porque la levadura consumió todos los azúcares fermentables que podía y únicamente queda en la matriz del sustrato los iones, la materia orgánica y los sólidos que no se transforman y que constituyen esos grados Brix finales. En todos los experimentos realizados en este estudio se evaluaron los grados Brix, obteniendo como resultado final 6 grados en prácticamente todos los ensayos; además se mantuvo constante el pH hasta el final del proceso, ya que, como productos de la fermentación alcohólica, además de etanol y CO₂, se obtienen ácidos orgánicos (láctico, succínico, málico, entre otros) que, aunque se producen en pequeña cantidad afectan a los valores de pH provocando un descenso del mismo, igualmente la formación de CO₂ influye en la acidificación del medio, ya que al tratarse de medio acuoso parte del CO₂ generado se disuelve en el mucílago formando ácido carbónico (Hernández, 2017), es así que durante las primeras 24 horas de fermentación se requirió constantemente la adición de una solución de NaOH 1N, pasado este tiempo esta variación fue menor.

4.1.1.2. Correlación de las variables del diseño experimental.

En la Tabla 21 se muestran los resultados obtenidos en cada ensayo de la matriz experimental realizados durante este estudio.

Tabla 60

Concentraciones de biomasa aplicando el método analítico peso seco a diferentes condiciones de operación

Experimento	Condiciones de operación			Promedio de concentración Final [g/L]
	X ₁ ^a	X ₂ ^b	X ₃ ^c	
1	25	4,0	1	89,4533
2	35	4,0	1	90,5267
3	25	5,0	1	84,5556
4	35	5,0	1	86,1311
5	25	4,0	3	92,0067
6	35	4,0	3	90,9880
7	25	5,0	3	67,9444
8	35	5,0	3	78,1378
9	30	4,5	2	77,3667
9	30	4,5	2	68,3578

^a Temperatura (°C). ^b pH. ^c Concentración de Levadura (g/L).

Los resultados de la concentración final de biomasa del experimento 9 y su réplica fueron 77,3667 g/L y 68,3578 g/L, respectivamente; estos valores tienen un porcentaje de error de 6,18% entre sí, esta variación pudo deberse a la baja reproducibilidad que tiene el método empleado, sin embargo, ambos valores fueron considerados para el análisis de la matriz experimental.

En la Tabla 22 se muestra la matriz de diseño estadístico de experimentos para considerar el efecto de las variables en el proceso.

Tabla 63
Matriz de diseño estadístico

Experimento	X ₁ ^a	X ₂ ^b	X ₃ ^c	y
1	- 1	- 1	- 1	89,4533
2	1	- 1	- 1	90,5267
3	- 1	1	- 1	84,5556
4	1	1	- 1	86,1311
5	- 1	- 1	1	92,0067
6	1	- 1	1	90,9880
7	- 1	1	1	67,9444
8	1	1	1	78,1378
9	0	0	0	72,8622

^a Temperatura (°C). ^b pH. ^c Concentración de Levadura (g/L).

En la Tabla 23 se muestran las interacciones de los efectos (variables), las cuales se obtuvieron aplicando el diseño estadístico de experimentos en el software Statgraphics® Centurion XVI. II.

Tabla 66
Resultados de las interacciones de los efectos

Coefficientes codificados	Valor
Promedio	B ₀ 83,6229
X ₁ ^a	B ₁ 1,4779
X ₂ ^b	B ₂ -5,7757
X ₃ ^c	B ₃ -2,6987
X ₁ · X ₂	B ₁₂ 1,4643
X ₁ · X ₃	B ₁₃ 0,8157
X ₂ · X ₃	B ₂₃ -3,4524
X ₁ · X ₂ · X ₃	B ₁₂₃ 1,3388

^a Temperatura (°C). ^b pH. ^c Concentración de Levadura (g/L).

El valor $B_0 = 83,6229$ indica alrededor de qué valor han variado las respuestas. También corresponde al valor predicho en el centro del dominio, sin embargo, de forma experimental se obtuvo que el valor en el centro del dominio fue 72,8622; esta diferencia indica que se podría ajustar el dominio experimental.

Los efectos se representaron en un diagrama de Pareto (Figura 19) para así visualizar cómo influyen los efectos principales, las interacciones dobles y la interacción triple en la variable de respuesta (concentración de biomasa). El efecto principal que tuvo mayor impacto fue el pH y el de menor impacto fue la interacción doble de la temperatura con la concentración de levadura. Otro estudio reportó que la temperatura (Macías y Saavedra, 2017) es una de las variables más importantes, sin embargo, los efectos de las concentraciones de azúcares y el pH también son significativos (Muñoz, 2013).

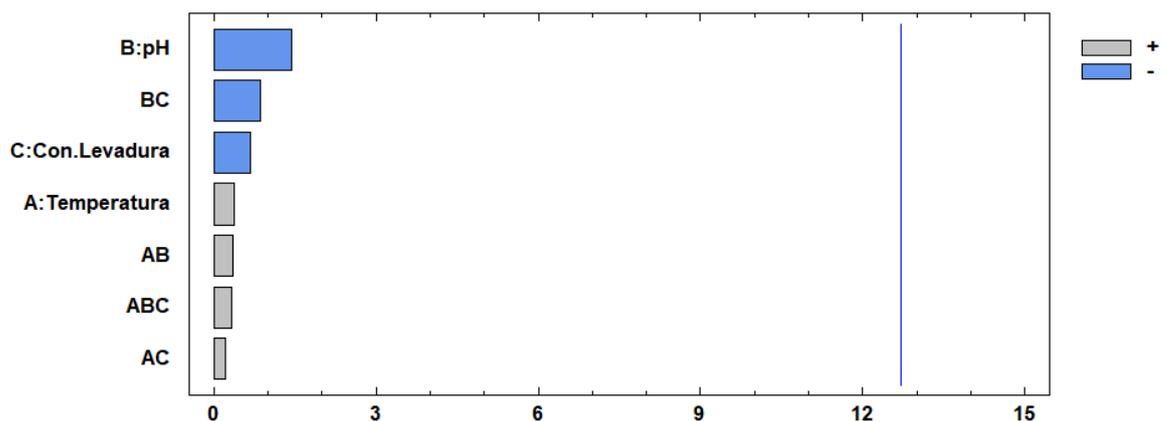


Figura 50. Pareto de efectos estimados para la concentración de biomasa.

Adicionalmente, se efectuó una manipulación de las variables en el diagrama de Pareto y se identificó una mejora en nivel de significancia como se muestra en la Figura 20.

Para aplicar un análisis estadístico ANOVA es necesario realizar cuando menos dos réplicas del experimento para estimar una suma de cuadrados del error (Gutiérrez y Salazar, 2008).

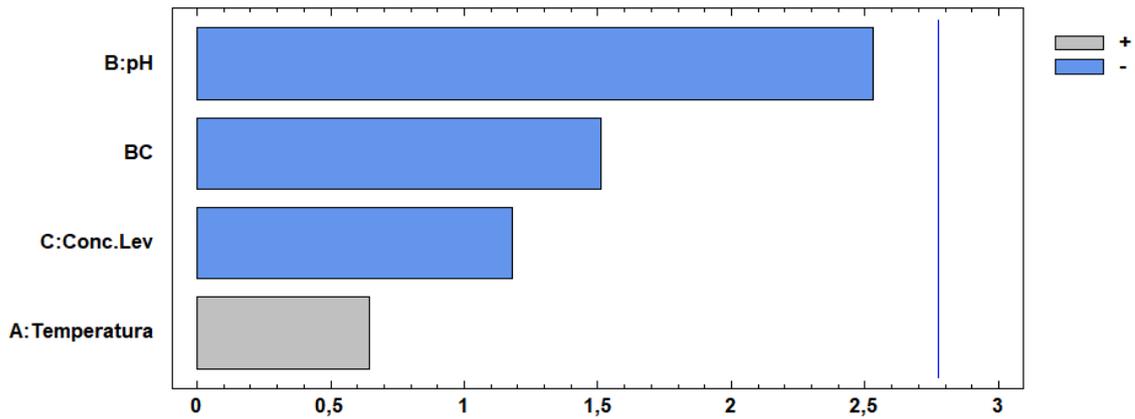


Figura 53. Pareto para la concentración de biomasa sin considerar algunos efectos

4.1.1.2.1. Efectos principales.

En la Figura 21 se muestran los efectos principales, en donde se observó que un cambio en los niveles de temperatura de 25 a 35 °C generó un incremento en la concentración final de biomasa; mientras que al variar el pH de 4 a 5 provocó una fuerte disminución en la variable de salida y en cuanto a la concentración de levadura un aumento de 1 a 3 g/L indujo a que la variable analizada disminuya.

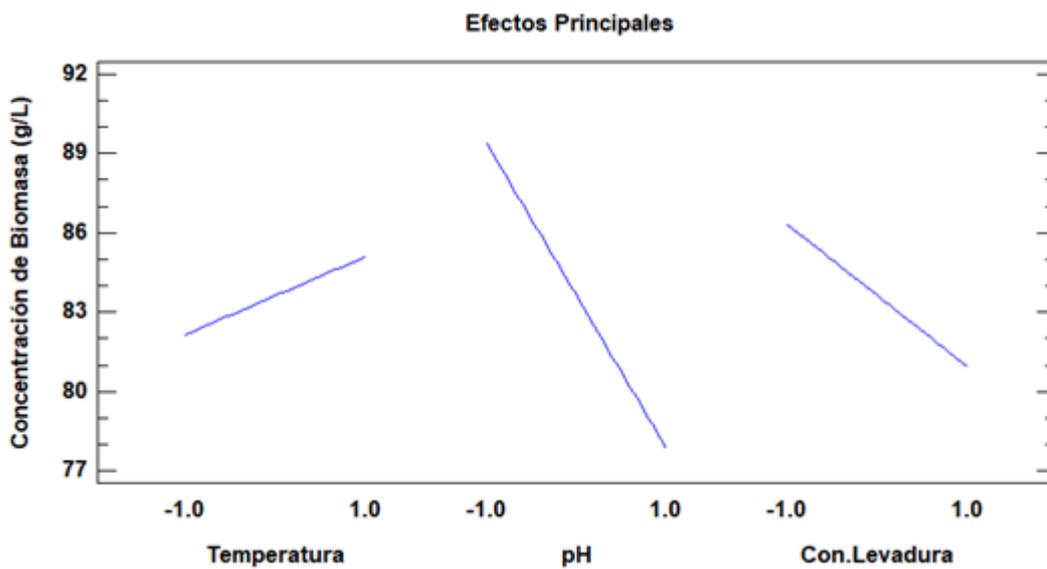


Figura 56. Representación de los efectos principales para la concentración de biomasa.

4.1.1.2.2. Interacciones dobles.

En la Figura 22 se muestran las interacciones dobles.

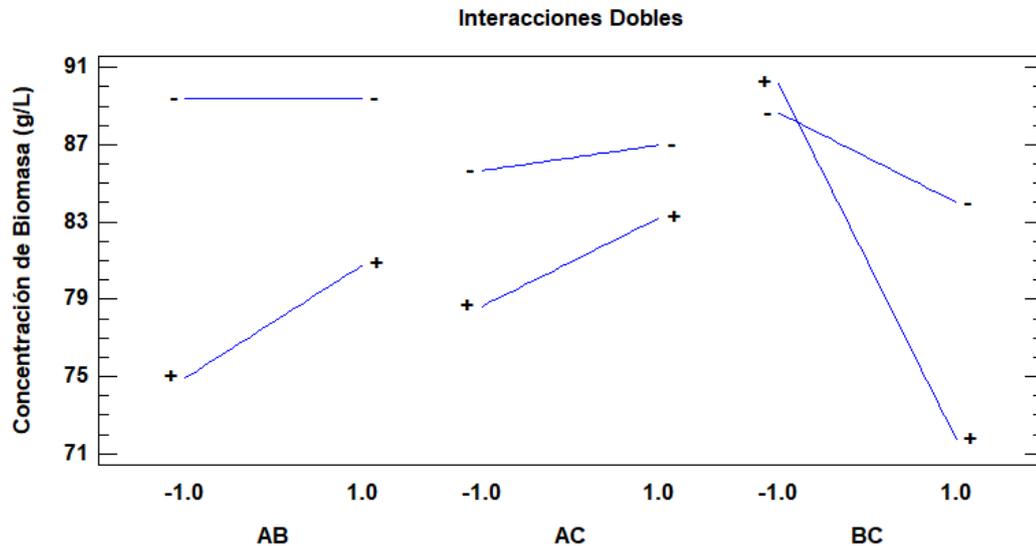


Figura 59. Representación de las interacciones dobles para la concentración de biomasa. A: Temperatura (°C). B: pH. C: concentración de levadura (g/L).

- AB (Temperatura – pH): En esta interacción en particular se observó que si se trabaja con pH de 4 prácticamente da lo mismo utilizar cualquiera de las dos temperaturas; mientras que con pH de 5 si se trabaja con una temperatura de 35 °C la concentración final de biomasa aumenta.
- AC (Temperatura – Concentración de levadura): En esta interacción se observó que si se trabaja con una concentración de levadura de 1 g/L no existe mayor cambio en la variable de salida al aumentar la temperatura; mientras que si se trabaja con 3 g/L si existe un mayor incremento en la concentración final de biomasa al utilizar una temperatura de 35 °C.
- BC (pH – Concentración de levadura): En esta interacción se observó que, si se trabaja con pH de 4, prácticamente da lo mismo utilizar cualquiera de las dos concentraciones de levadura; mientras que con pH de 5 la concentración final de biomasa disminuye, siendo esto más notorio cuando se utiliza la concentración de levadura de 3 g/L.

4.1.1.2.3. *Interacción Triple.*

El valor B_{123} indica en qué grado el efecto de un factor depende del valor combinado de los otros dos factores. En este caso, el valor es similar a un principal que es la temperatura y a la interacción doble de la temperatura con el pH.

En la Figura 23 se muestra la representación geométrica del diseño factorial 2^3 , para este estudio.

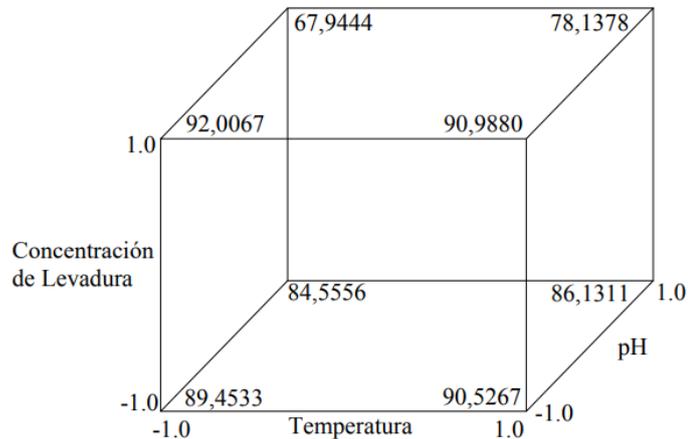


Figura 62. Gráfico de cubo y respuesta predicha para la concentración de biomasa.

De la Figura 21 y la Figura 22 se concluye que hay tres condiciones que aumentan la concentración final de biomasa: $(-1, -1, 1) = (25 \text{ }^\circ\text{C}, 4, 3 \text{ g/L})$; $(1, -1, 1) = (35 \text{ }^\circ\text{C}, 4, 3 \text{ g/L})$ y $(1, -1, -1) = (35 \text{ }^\circ\text{C}, 4, 1 \text{ g/L})$. Esto también se puede apreciar en la gráfica de cubo de la Figura 23, en la que se aprecia la respuesta predicha en cada punto del diseño. La predicción en cada punto del diseño, en unidades codificadas, está dado por la Ecuación 17.

Ecuación 17: Ecuación polinomial de los resultados de la concentración de biomasa.

$$y = 83,6229 + 1,4779X_1 - 5,7757X_2 - 2,6987X_3 + 1,4643X_1X_2 + \dots$$

$$\dots + 0,8157X_1X_3 - 3,4524X_2X_3 + 1,3388X_1X_2X_3$$

La predicción en cada punto del diseño, en unidades codificadas, sin considerar las interacciones dobles de: temperatura – pH y temperatura – concentración de levadura; y la interacción triple: temperatura – pH – concentración de levadura, está dado por la Ecuación 18.

Ecuación 18: Ecuación polinomial de los resultados de la concentración de biomasa, sin considerar algunos efectos.

$$y = 83,6229 + 1,4779X_1 - 5,7757X_2 - 2,6987X_3 - 3,4524X_2X_3$$

En la Figura 23, comparando la respuesta predicha en la cara frontal contra la cara posterior, se nota que todos los experimentos donde el pH trabaja en su nivel bajo, producen mayor concentración final de biomasa que cuando este pH se encuentra en su valor alto. Las respuestas predichas en los tres puntos óptimos son: 92,0067 g/L, 90,9880 g/L y 90,5267 g/L.

Con base en lo anterior, se decidió realizar una comparación de estos valores con las concentraciones de alcohol obtenidos bajo las mismas condiciones de operación en otro estudio mencionado en el apartado 3.3.4.2., conjuntamente se analizó el tiempo que tomó obtener dichos valores.

4.1.1.3. Parámetros óptimos de operación.

En Tabla 24 se muestran los resultados óptimos de las concentraciones finales de biomasa y de alcohol con sus respectivos tiempos, los mismos se representaron gráficamente (Figura 24) para así visualizar cuales fueron las condiciones más óptimas de operación, en donde se pudo evidenciar que los mejores resultados con respecto a la concentración de alcohol y tiempo correspondieron a la concentración final de biomasa de 90,9880 g/L; razón por la cual se concluyó que las condiciones óptimas de operación fue (1, -1, 1) = (35 °C, 4, 3 g/L); estos valores son consistentes con los reportados en otro estudio: 33 °C y pH de 4 (Leal, Tarantino, Hernández, y Morán, 2014).

Tabla 69

Comparación de las concentraciones finales de biomasa y etanol con sus respectivos tiempos de fermentación alcohólica

Tiempo [h]	Concentración Final [g/L]	
	Biomasa	Alcohol
58,00	90,5267	20,1425
80,75	92,0067	21,1016
34,50	90,9880	21,8269

Adicionalmente una vez determinada las condiciones óptimas de operación se realizó una réplica de la misma (Anexo 2), cuyo resultado fue 91,3333 g/L, es decir con un porcentaje de error del 0,19% entre ambos experimentos.

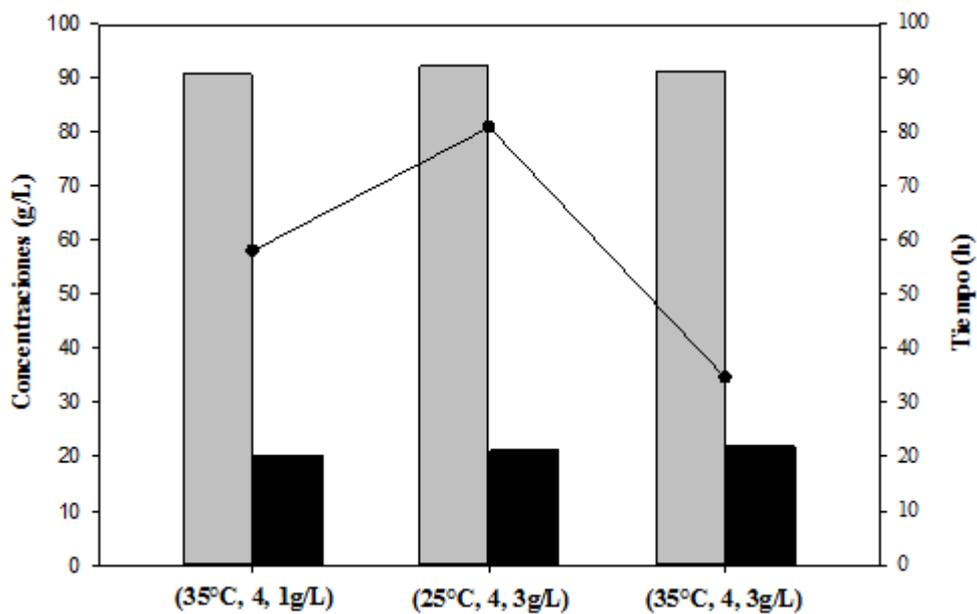


Figura 65. Concentraciones finales de biomasa y etanol obtenidos durante el proceso de fermentación discontinua. Símbolos: barra gris, biomasa; barra negra, etanol; línea continua, tiempo.

4.2. Modelo de Monod

El valor de la tasa de crecimiento específico (μ) de la fermentación discontinua de etanol a partir del mucílago de cacao fue de $0,1806 \text{ h}^{-1}$, resultado similar ($0,197 \text{ h}^{-1}$) fue reportado por Macías y Saavedra (2017). La diferencia del 4,34% entre estos valores pudo deberse

a los diferentes métodos empleados para la determinación de la producción de biomasa, ya que el otro estudio realizó la cuantificación de levaduras utilizando placas de conteo directo de levaduras 3M petrifilm; además el tiempo de muestreo fue únicamente por 22 horas.

En la Figura 25 se puede visualizar claramente la fase de crecimiento exponencial de la concentración de biomasa en las condiciones óptimas de operación. Los valores de X_L , X_0 , t_L y t_0 fueron 79,7367 g/L; 0,7967 g/L; 25,5h y 0 h; respectivamente.

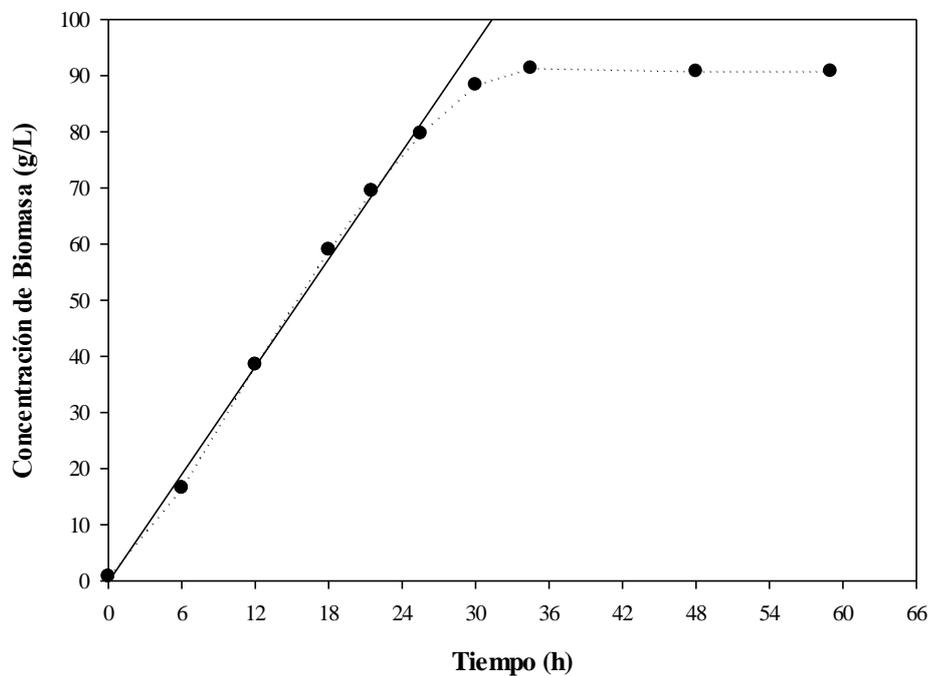


Figura 68. Fase exponencial en la curva de producción de biomasa durante el proceso de fermentación discontinua de etanol. Símbolos: círculos cerrados, datos experimentales; línea continua, pendiente de la fase de crecimiento exponencial.

4.3. Modelo logístico

En la Tabla 25 se muestran los resultados de los parámetros cinéticos obtenidos con este modelo.

Tabla 72

Parámetros cinéticos obtenidos con el modelo logístico

Parámetros	Experimental	Calculado
μ_{max} (h ⁻¹)	-	0,2251
X_i (g/L)	0,7967	2,9988
X_{max} (g/L)	90,9880	90,5951

La cinética típica de crecimiento de biomasa se muestra en la Figura 26, la cual representa la relación entre la concentración de biomasa y el tiempo de fermentación, incluyendo tanto los datos experimentales como la curva basada en el modelo cinético logístico.

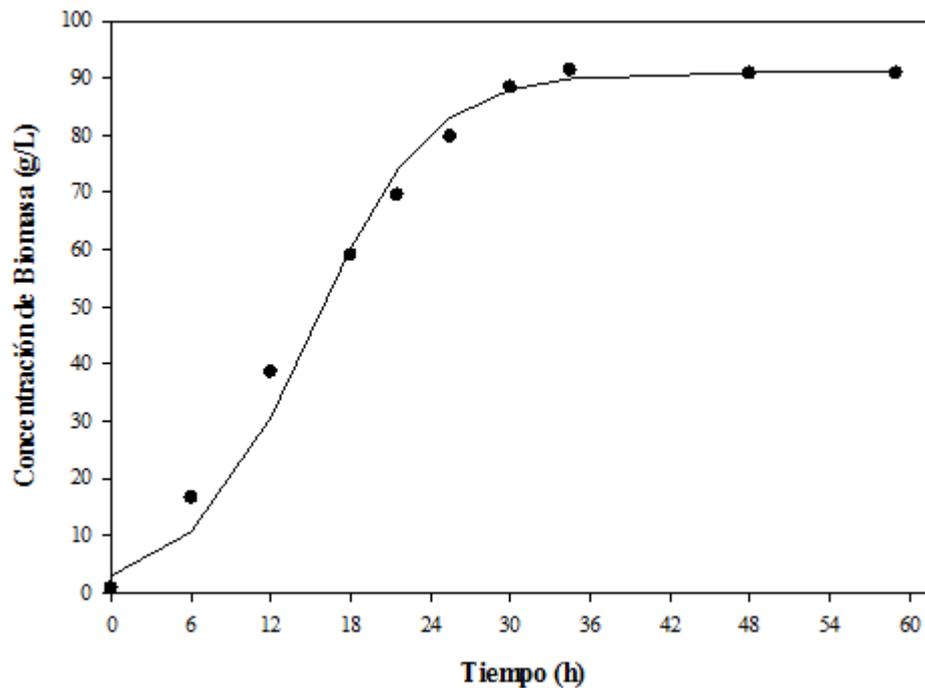


Figura 71. Curva de producción de biomasa y el resultado de ajustar la ecuación logística integrada a los datos experimentales obtenidos durante el proceso de fermentación discontinua de etanol. Símbolos: círculos cerrados, datos experimentales; línea continua, curva ajustada.

El modelo logístico ajustó muy bien los datos ($R^2 = 0,9861$), aunque no incluyó el consumo de sustrato y los términos de inhibición del producto como lo hace el modelo de Andrew y Levenspiel. La curva comienza con una fase de crecimiento rápido donde la concentración de biomasa aumenta exponencialmente. El valor calculado de la concentración máxima de biomasa ($X_{max} = 90,5951\text{g/L}$) es consistente con el dato

experimental ($X_{max} = 90,9880\text{g/L}$). Sin embargo el valor calculado para la concentración inicial de biomasa ($X_i = 2,9988\text{g/L}$) es mayor al valor determinado experimentalmente ($X_i = 0,7961\text{g/L}$), esto probablemente ocurrió debido a que este modelo subestimó la concentración de biomasa durante las primeras horas de fermentación; dado que el modelo logístico no tiene una fase de latencia, la subestimación de los datos implica que de hecho podría haber ocurrido un retraso, razón por la cual se realizó un nuevo ajuste empleando la ecuación de Gompertz modificado para calcular el tiempo de retraso y verificar si así se obtiene un mejor ajuste (basado en el R^2). El análisis de los datos experimentales y estadísticos obtenidos de la fermentación discontinua de mucílago de cacao demostró que la ecuación logística resultó ser un modelo cinético apropiado para describir el crecimiento de biomasa en este sistema en particular.

Los valores de la Tabla 25 se sustituyeron en la Ecuación 6, quedando de la siguiente manera:

$$X = \frac{2,9988\text{g/L} * \exp(0,2251h^{-1} * t)}{1 - \left[\left(\frac{2,9988\text{g/L}}{90,5951\text{g/L}} \right) (1 - \exp(0,2251h^{-1} * t)) \right]}$$

Se realizó una comparación de los datos experimentales con los valores predichos por este modelo, empleando el software StatSoft Statistica 10. Esta correlación se muestra en la Figura 27. La función que describe esta correlación tiene la forma $y = x$. Con base en el indicador estadístico (R^2), cuyo valor fue 0,9967 y dado que todos los puntos se encuentran en la banda de confianza del 95%, nuevamente se pudo concluir que este modelo cinético puede prever el comportamiento de este sistema en particular bajo las condiciones definidas.

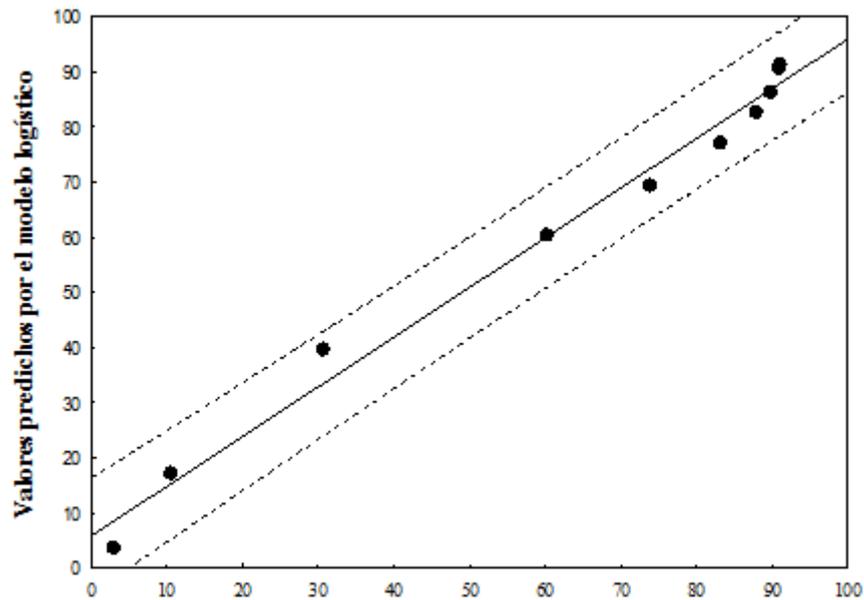


Figura 74. Correlación entre la concentración de biomasa calculada por el modelo logístico y los datos experimentales. Símbolos: línea punteada, banda de confianza del 95%; línea continua, coeficiente de correlación de 1.

4.4. Modelo de Gompertz modificado

Los valores de la tasa de producción de biomasa, se muestran en la Figura 28. Se puede observar que desde el momento de la inoculación la tasa de producción de biomasa aumenta intensamente, a las 12 h alcanza su máximo (3,6644 g/Lh) y luego disminuye hasta las 48 h, cuando alcanza un valor muy cercano a cero. Dado que este valor siempre fue positivo durante todo el proceso, se puede concluir que el microorganismo productor no entra en la fase de muerte y las 48 h pueden ser asumidas como el momento de transición del microorganismo productor de la fase exponencial a la fase estacionaria de crecimiento. La disminución de este parámetro cinético durante las 48 horas, se debe a que los azúcares fueron consumidos por las levaduras en el proceso de fermentación por lo que se considera que continuar con este proceso por más horas sería económicamente injustificable. El resultado obtenido muestra un mayor valor al reportado por otro estudio (Dodić et al., 2012) que empleó la misma levadura de panadería *S. cerevisiae*; esta diferencia pudo ocurrir probablemente por la distintas condiciones de temperatura, pH, concentración de levadura y tiempo de fermentación.

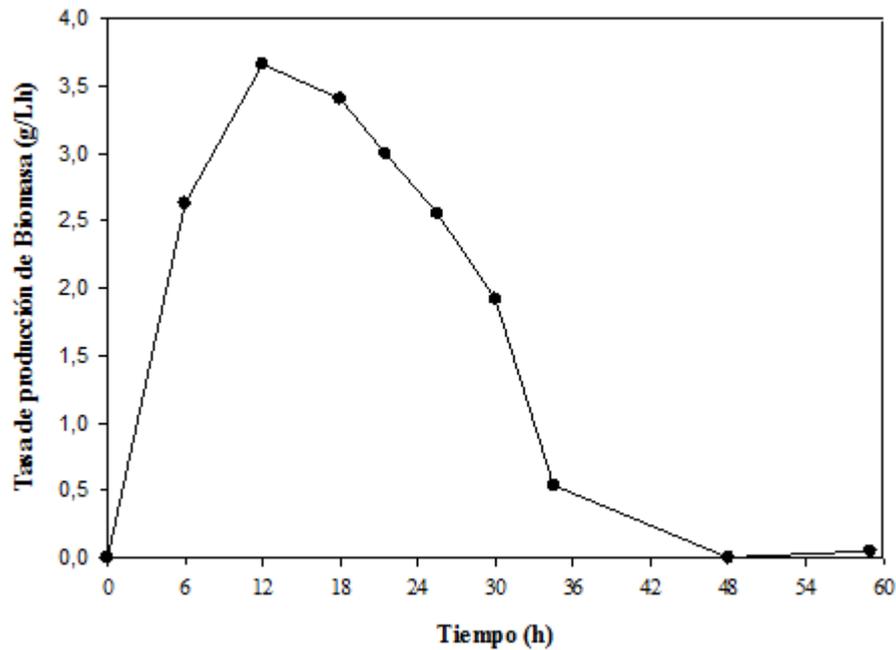


Figura 77. Tasa de producción de biomasa obtenidos durante el proceso de fermentación discontinua de etanol en condiciones óptimas de operación.

En la Tabla 26 se muestra los resultados de los parámetros cinéticos obtenidos con este modelo.

Tabla 75
Parámetros cinéticos obtenidos con el modelo de Gompertz modificado

Parámetros	Experimental	Calculado
r_m (g/Lh)	3,6644	3,9044
t_l (h)	-	2,0622
X_i (g/L)	0,7967	3,6636
X_{max} (g/L)	90,9880	89,4737

El modelo de Gompertz modificado ajustó muy bien los datos ($R^2 = 0,9930$), aunque no incluyó el consumo de glucosa y los términos de inhibición del producto como el modelo de Andrew y Levenspiel. Los valores calculados de la tasa de producción de biomasa ($r_m = 3,9044$ g/Lh) y la concentración máxima de biomasa ($X_{max} = 89,4737$ g/L) son consistentes con los datos experimentales ($r_m = 3,6644$ g/Lh y $X_{max} = 90,9880$ g/L). Sin embargo, el valor calculado para la concentración inicial de biomasa ($X_i = 3,6636$ g/L) es mayor al dato experimental ($X_i = 0,7961$ g/L), esto probablemente ocurrió debido a que

en la curva experimental no se pueden observar la fase de latencia y la de adaptación debido al tiempo de muestreo. Los resultados mostraron que este modelo ajustó los datos ligeramente mejor que el modelo logístico (basado en el R^2). Esto se debió principalmente a que se ajustaron los datos para la fase de retardo. En general, un modelo con más parámetros, en este caso t_l , tiene un valor R^2 más alto (Phukoetphim, et al., 2017). El tiempo de retraso para este experimento se estimó en 2,0622 h. El valor reportado por Macías y Saavedra (2017) fue de 2 h, valor muy semejante al determinado en este estudio.

Los valores en la Tabla 26 se sustituyeron en la Ecuación 8, quedando de la siguiente manera:

$$X = 3,6636 + \left\{ 89,4737 \cdot \exp \left\{ -\exp \left[\frac{3,9044 \cdot \exp(1)}{89,4737} \cdot (2,0622 - t) + 1 \right] \right\} \right\}$$

En la Figura 29 se observa el ajuste realizado con el modelo de Gompertz modificado.

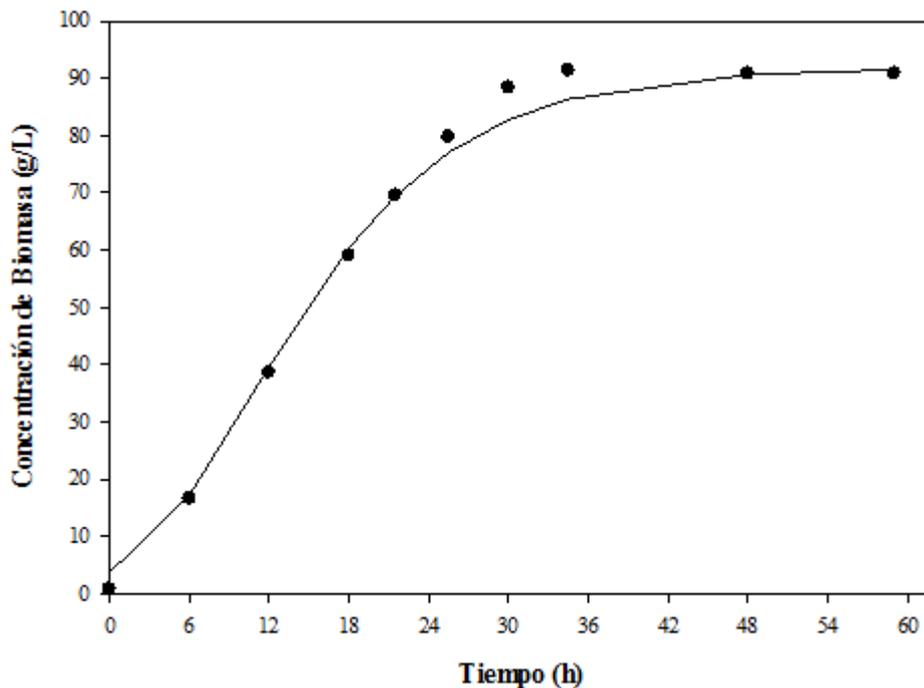


Figura 80. Curva de producción de biomasa y el resultado de ajustar la ecuación de Gompertz modificado a los datos experimentales obtenidos durante el proceso de fermentación discontinua de etanol. Símbolos: círculos cerrados, datos experimentales; línea continua, curva ajustada.

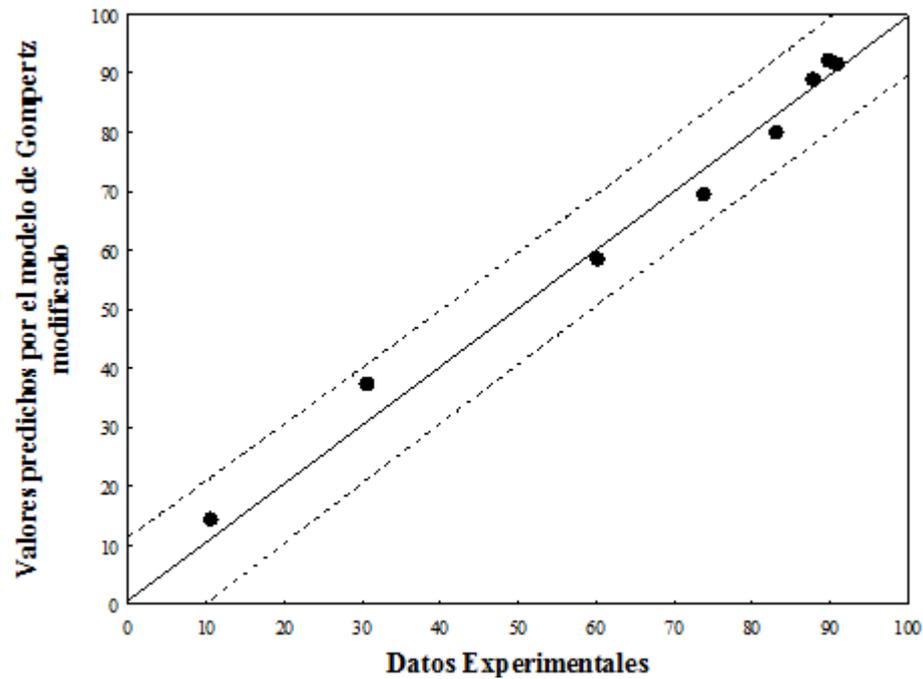


Figura 83. Correlación entre la concentración de biomasa calculada por el modelo de Gompertz modificado y los datos experimentales. Símbolos: línea punteada, banda de confianza del 95%; línea continua, coeficiente de correlación de 1.

Se realizó una comparación de los datos experimentales con los valores predichos por este modelo, empleando el software StatSoft Statistica 10. Esta correlación se muestra en la Figura 30. La función que describe esta correlación tiene la forma $y = x$. Con base en el indicador estadístico (R^2), cuyo valor fue 0,9981 y dado que todos los puntos se encuentran en la banda de confianza del 95%, nuevamente se pudo concluir que este modelo cinético puede prever el comportamiento de este sistema en particular bajo las condiciones definidas.

4.5. Modelo de Andrew y Levenspiel

En la Tabla 27 se muestran los resultados obtenidos mediante este modelo. La concentración máxima de etanol para el crecimiento ($P_{X,max}$) fue de 18,9683 g/L. La concentración máxima de etanol para la fermentación con etanol ($P_{P,max}$) fue de 19,3832 g/L, similar al valor experimental de 21,8269 g/L. La constante de saturación de etanol (K_{SP}) fue 34,9954 g/L. Los parámetros K_{IS} y K_{IP} fueron 400 y 250 g/L, respectivamente,

los cuales fueron relativamente más bajos en comparación con $S^2 - (93,125 \text{ g/L})^2 -$ (Macías y Saavedra, 2017), lo que indica que el sustrato a concentraciones más altas podría inhibir la formación de productos, especialmente el crecimiento de la levadura. El coeficiente de mantenimiento celular (m) se fijó en $1,00\text{E-}5 \text{ h}^{-1}$ debido a que este valor tuvo un pequeño efecto en la predicción del modelo de crecimiento celular.

El rendimiento de biomasa ($Y_{X/S}$) fue 3 g/g ; sin embargo, este valor debe ser menor a la unidad debido a que no todo el sustrato se consume durante la producción de biomasa ya que también es utilizado en otros procesos como el mantenimiento celular. La razón por la cual se obtuvo este valor alto pudo deberse a que solamente se consideró el consumo de glucosa reportado en otro estudio (Macías y Saavedra, 2017) el mismo que se tomó como referencia para realizar el modelado, sin considerar la fructosa y sacarosa, sustratos igualmente asimilables por la levadura *S. cerevisiae* las cuales están presentes en el mucílago de cacao, lo que ocasionó que se obtenga un resultado de rendimiento de biomasa mayor al teórico. El rendimiento de etanol ($Y_{P/S}$) fue de $0,2999 \text{ g/g}$, mayor al experimental $0,2354 \text{ g/g}$, es decir con una diferencia del $12,05\%$; sin embargo, ambos valores son menores al teórico $0,511 \text{ g/g}$ (Vázquez y Dacosta, 2007), ya que alcanzar ese valor es difícil porque la levadura utiliza la glucosa para la producción de otros metabolitos. Si se compara con otros rendimientos obtenidos de procesos fermentativos a partir de jugo de sorgo dulce: $0,50 \text{ g/g}$ (Ariyajaroenwong, et al., 2016) y $0,48 \text{ g/g}$ (Phukoetphim, et al., 2017) puede notarse que son significativamente superiores al de este estudio, esto puede deberse a las diferentes fuentes de azúcar en el medio, como son extractos de levadura, que pueden contribuir significativamente con la cantidad final de etanol, aumentando el rendimiento del mismo (Farias, De Andrade, y Mauger-Filho, 2014).

La tasa máxima de producción específica de etanol (q_{max}) fue de 1 g/gh , este bajo valor pudo deberse a que se consideró únicamente la glucosa como sustrato, es decir si se considerara la cantidad de sustrato total este valor tendría que incrementar (Ariyajaroenwong, et al., 2016).

La tasa de crecimiento específico máximo (μ_{max}) para la producción de biomasa con el modelo logístico y el modelo de Andrew y Levenspiel fue de 0,2251 h⁻¹ y 0,2996 h⁻¹, respectivamente; es decir, se tuvo una diferencia del 14,20% entre ambos modelos con respecto a este parámetro cinético, esto pudo deberse a que el modelo de Andrew y Levenspiel si considera las constantes de inhibición del sustrato y del producto (etanol). La concentración máxima de biomasa (X_{max}) fue de 88, 3216 g/L siendo consistente con el valor experimental 90,9880 g/L. Otros valores (0,194 h⁻¹ y 0,154 h⁻¹) obtenidos en fermentaciones de etanol a partir de remolacha azucarera y jugo de sorgo dulce para *S. cerevisiae* (Dodić, et al., 2012; Phukoetphim, et al., 2017), son menores a los de este estudio, lo que indicaría que la variación de este parámetro cinético depende de muchos factores, como la cepa de levadura, el sustrato y las condiciones de operación en la fermentación (Phukoetphim, et al., 2017).

Tabla 78
Parámetros cinéticos obtenidos con el modelo de Andrew y Levenspiel

Parámetros	Resultado	Unidad
μ_{max}	0,2996	h ⁻¹
q_{max}	1	g/gh
K_S	11,4492	g/L
K_{SP}	34,9954	g/L
K_{IS}	400	g/L
K_{IP}	250	g/L
$Y_{X/S}$	3	g/g
$Y_{P/S}$	0,2999	g/g
m	1,00E-5	h ⁻¹
$P_{X,max}$	18,9683	g/L
α	0,1742	g/L
β	2,2555	g/L

Los valores de los parámetros de la Tabla 27 dio un buen ajuste con coeficientes de determinación muy buenas ($R^2 > 0,90$) (Figura 31). Estos valores se sustituyeron en la Ecuaciones 14, 15 y 16, quedando de la siguiente manera:

- Biomasa

$$\frac{dX}{dt} = X \left(\frac{0,2996S}{11,4492 + S + \frac{S^2}{400}} \right) \left(1 - \frac{P_E}{18,9683} \right)^{0,1742}$$

- Etanol:

$$\frac{dP_E}{dt} = X \left(\frac{S}{34,9954 + S + \frac{S^2}{250}} \right) \left(1 - \frac{P_E}{21,8269} \right)^{2,2555}$$

- Glucosa:

$$-\frac{dS}{dt} = \frac{1}{3} \left(\frac{dX}{dt} \right) + \frac{1}{0,2999} \left(\frac{dP_E}{dt} \right) + 0,00001X$$

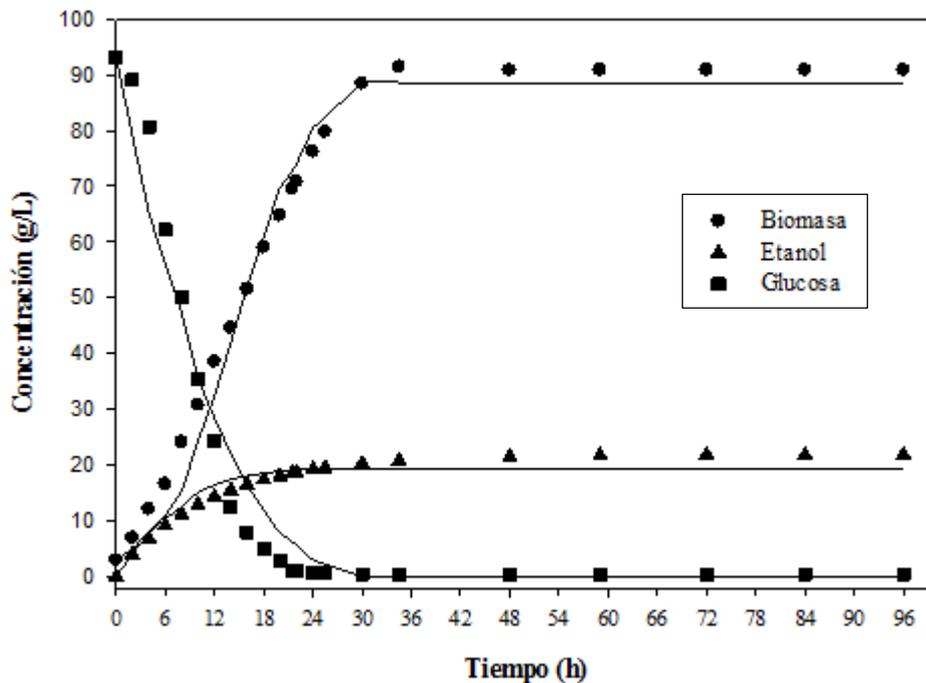


Figura 86. Crecimiento de biomasa, consumo de glucosa y producción de etanol en la fermentación discontinua, con el modelo de Andrew y Levenspiel. Símbolos: figuras sólidas, datos experimentales; línea continua, curva ajustada.

En la Tabla 28 se muestran los coeficientes de determinación obtenidos ajustando los datos experimentales de concentración de biomasa, etanol y glucosa con el modelo de Andrew y Levenspiel, todos los valores de R^2 excedieron 0,75 (valor aceptable más bajo) (Ariyajaroenwong, et al., 2016), lo que refleja el buen rendimiento del modelo.

Tabla 81
Coefficientes de determinación (R^2) del modelo de Andrew y Levenspiel

Modelo	R^2	Interpretación
Biomasa	0,9794	Precisión muy alta*
Etanol	0,9414	Precisión muy alta*
Glucosa	0,9618	Precisión muy alta*

* (Ariyajaroenwong, et al., 2016).

Se realizó una comparación de los datos experimentales con los valores predichos por este modelo, empleando el software StatSoft Statistica 10. Esta correlación se muestra en la Figura 32; cómo se puede ver, aparte de los valores muy altos de R^2 , la mayoría de los puntos de datos se encuentran en la banda de predicción del 95%. Esto demuestra que este modelo se puede utilizar de forma óptima para describir el perfil de biomasa, etanol y glucosa.

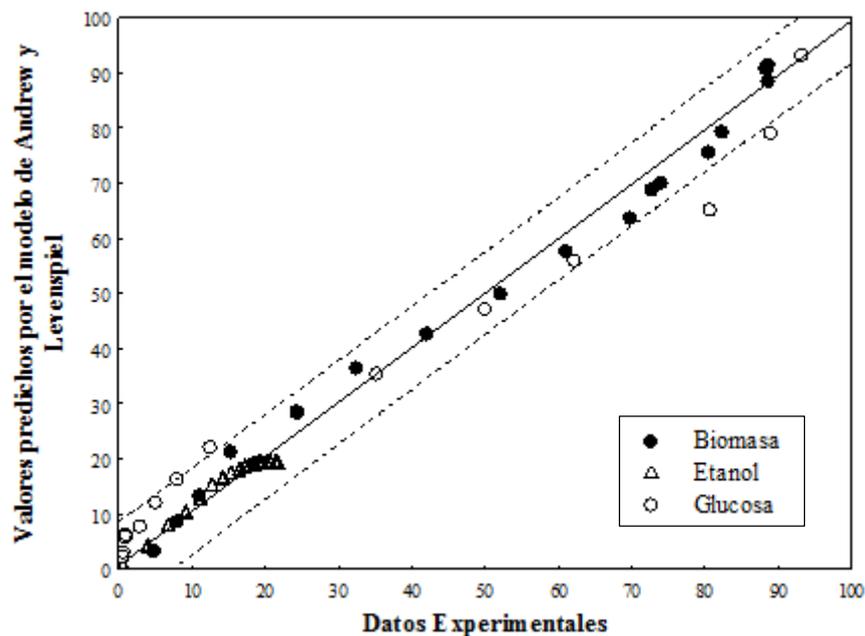


Figura 89. Correlación entre la concentración de biomasa, etanol y glucosa calculados por el modelo de Andrew y Levenspiel y los datos experimentales. Símbolos: línea punteada, banda de confianza del 95%; línea continua, coeficiente de correlación de 1.

5. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1. Conclusiones

Las nueve curvas de crecimiento de biomasa obtenidas mediante el método analítico peso seco presentaron el patrón típico de crecimiento microbiano, donde se visualizaron las diferentes fases; siendo este método adaptable al proceso fermentativo con residuo mucilaginoso de cacao CCN – 51, y además ventajoso ya que no requiere de muchos recursos para su aplicación.

La fase de latencia se pudo apreciar únicamente en cuatro curvas, debido a que el tiempo de esta era demasiado corto, mientras que la fase exponencial se observó claramente en todas ellas. El estado estacionario se alcanzó a diferentes tiempos, siendo el menor 34,5 horas y el mayor 166,5 horas, correspondientes a los experimentos 6 y 1, respectivamente. La fase de declive no se observó en ninguna curva debido a que resultó innecesario el gasto de recursos ya que el objetivo de este estudio fue alcanzar la máxima concentración de biomasa, la misma que se obtuvo al llegar al estado estacionario.

Una medida indirecta que se utilizó para conocer el momento en que la fermentación alcanzaba el estado estacionario, fueron los grados Brix, debido a que este valor llegó a ser constante al mismo tiempo que la concentración de biomasa lo cual significaba que los azúcares asimilables del residuo mucilaginoso prácticamente se habían consumido por completo.

Al aplicar el diseño factorial 2^3 para estudiar el efecto de las variables del proceso de fermentación discontinua de etanol el factor que mayor influyó fue el pH, siendo factores menos influyentes la concentración de levadura *S. cerevisiae* y la temperatura; además se observó que existían tres condiciones favorables de operación, razón por la cual se realizó una comparación con la concentración de etanol para residuo mucilaginoso; adicionalmente se analizó el tiempo de producción de biomasa siendo este factor lo que determinó las condiciones óptimas de operación (1, -1, 1) = (35°C, 4, 3g/L) obteniendo una concentración final de biomasa de 90,9880 g/L; sin embargo las concentraciones de 90,5267 g/L (35°C, 4, 1g/L) y 92,0067 (25°C, 4, 3g/L), son muy semejantes al valor



óptimo, pero a pesar de las ventajas económicas que pudieran tener; como reducción de materia prima inicial (levadura) y disminución de consumo energético, respectivamente, se ven opacadas por el tiempo que requieren para alcanzar dichas concentraciones.

En este estudio, se utilizaron dos modelos cinéticos empíricos para describir el crecimiento de biomasa durante la fermentación discontinua sin adición de nutrientes. El modelo logístico, y modelo de Andrew y Levenspiel pronunciaron de manera aceptable el perfil de biomasa en la fase de crecimiento exponencial. Sin embargo, el modelo logístico no pudo estimar la concentración de biomasa durante la etapa inicial, ya que este no considera la fase de latencia.

Los resultados de las simulaciones de los modelos mostraron un buen ajuste con los datos experimentales obtenidos en diferentes tiempos de fermentación. La concentración de biomasa podría expresarse mediante la ecuación logística y el modelo de Andrew y Levenspiel con una precisión muy alta ($R^2 > 0,90$). Ambos modelos presentan una buena aplicabilidad para predecir y controlar sistemas fermentativos con el mucílago de cacao CCN – 51.

De acuerdo a los resultados experimentales obtenidos en este estudio, el mucílago de cacao CCN – 51, puede llegar a convertirse en una importante materia prima en la obtención de bioetanol, ya que contiene gran cantidad de azúcares fermentables, no requiere de tratamientos previos y es de fácil adquisición debido a que proviene de los residuos de la abundante actividad cacaotera del país.

5.2. Recomendaciones

Para un análisis estadístico apropiado se debería realizar réplicas de los experimentos, siendo un mínimo de dos, con la finalidad de comprobar los resultados obtenidos en este estudio, o emplear otro tipo de diseño experimental como por ejemplo la metodología de superficies de respuesta.



Para aumentar la concentración de biomasa durante la fermentación discontinua de etanol se podría trabajar con mayores concentraciones de levadura, pero manteniendo constantes los parámetros óptimos de temperatura y pH determinados en este estudio.

Para garantizar las constantes o parámetros cinéticos obtenidos mediante el modelo de Andrew y Levenspiel en este estudio, se debería realizar otros experimentos con diferentes concentraciones iniciales de azúcar, validando los resultados mediante los coeficientes de determinación (R^2) los cuales deben exceder 0,75 (valor aceptable más bajo).

Se debería determinar μ_{max} experimentalmente para confirmar el valor obtenido en este estudio; así mismo se debería emplear un método que cuantifique los azúcares totales del residuo mucilaginoso.

Con la finalidad de conocer la viabilidad económica al realizar fermentaciones con mucílago de cacao CCN – 51, se debería realizar un estudio económico sobre la rentabilidad del proceso, mediante la determinación de los costos que supondría llevarlo escala industrial.

REFERENCIAS

- Acosta, C. (2012). *Evaluación de la fermentación alcohólica para la producción de hidromiel* (tesis de maestría). Universidad Nacional de Colombia, Bogotá. Recuperado de biblioteca.universia.net
- Albornoz, P. (2015). *Ajuste de modelos matemáticos no lineales y su uso en cinéticas de inactivación de Escherichia coli ATCC 25922 inoculada en jugo de zanahoria por medio de pasteurización asistida con ultrasonido* (tesis de maestría). Universidad de Concepción, Chillán, Chile. Recuperado de repositorio.udec.cl
- Alonso, N. (2008). “*Determinación de la estabilidad química de la masa levaduriforme pigmentada seca obtenidas de levaduras aisladas*”, (tesis de pregrado). Universidad Austral de Chile. Recuperado de cybertesis.uach.cl
- Ariyajaroenwong, P., Laopaiboon, P., Salakkam, A., Srinophakun, P., y 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. doi: 10.1016/j.jtice.2016.06.023
- Arredondo, B., y Voltolina, D. (2007). Concentración, recuento celular y tasa de crecimiento. En B. Arredondo y D. Voltolina. (Eds.) *Métodos y herramientas analíticas en la evaluación de la biomasa microalgal* (pp. 21-29). La Paz, México: Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste. Recuperado de www.researchgate.net
- Arriagada, E., y Peralta, V. (2008). *Error Absoluto-Error Relativo*. Recuperado de es.scribd.com
- Asociación Nacional de Exportadores de Cacao [ANECACAO]. (2015). *Exportación ecuatoriana de cacao*. Recuperado de www.anecacao.com
- Aubanell, A., Benseny, A., y Delshams, A. (1993). *Útiles Básicos de Cálculo Numérico*. Barcelona, España: LABOR, S.A.
- Banco Central del Ecuador [BCE]. (2017). *Reporte de coyuntura sector agropecuario*. Recuperado de contenido.bce.fin.ec
- Brereton, R. (2003). *Chemometrics: Data Analysis for the Laboratory and Chemical Plant*. London, UK: John Wiley y Sons, Ltd. doi: 10.1002/0470863242



- Buitrago, J., y Tenjo, D. (2007). *Obtención de un sustrato fermentable de origen vegetal y su evaluación con células libres de Saccharomyces cerevisiae* (tesis de pregrado). Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá, Colombia. Recuperado de repository.javeriana.edu.co
- Camacho, L., y Torres, R. (2009). Implementación de diferentes técnicas analíticas de cepas *Pseudomonas putida* biodegradados de fenol. *Revista ION*, 23(1), 41–46. Recuperado de revistas.uis.edu.co
- Carrión, J. (2012). *Estudio de factibilidad para la producción y comercialización de cacao (Theobroma cacao L.) variedad CCN-51, Jama-Manabí* (tesis de pregrado). Universidad San Francisco de Quito, Ecuador. Recuperado de repositorio.usfq.edu.ec
- CasaLuker. (2016). *Criollos y Trinitarios*. Recuperado de www.cacaofinodearoma.com
- Castillo, A. (2013). *Determinación de parámetros de co - cultivo de Scheffersomyces stipitis y Saccharomyces cerevisiae para la fermentación de residuos lignocelulósicos para la obtención de bioetanol* (tesis de pregrado). Universidad Iberoamericana, México , D.F. Recuperado de www.bib.uia.mx
- Castro, G., Valbuena, E., Sánchez, E., Briñez, W., Vera, H., y Leal, M. (2008). Comparación de modelos sigmoidales aplicados al crecimiento de *Lactococcus lactis* subsp. *Lactis*. *Revista Científica (Maracaibo)*, 18(5). Recuperado de www.scielo.org.ve
- Cattaneo, C., Larcher, L., Togo, S., y Chailo, L. (2007). Aplicación de Método de Monte Carlo para el estudio de crecimiento de Bacterias y Levaduras. *Mecánica Computacional*, 26, 3380-3393. Recuperado de cimec.org.ar
- Cayré, M., Vignolo, G., y Garro, O. (2007). Selección de un modelo para describir la curva de crecimiento de bacterias lácticas y *Brochothrix thermosphacta* sobre emulsiones cárnicas cocidas. *Información Tecnológica*, 18(3), 23-29. doi: 10.4067/S0718-07642007000300004. Recuperado de scielo.conicyt.cl
- Chávez, G. (2006). *Producción de la Enzima Proteasa en Cultivo en Medio Sólido y Líquido Utilizando Rhizopus oryzae* (tesis de pregrado). Universidad Autónoma Agraria “Antonio Narro”, México. Recuperado de repositorio.uaaan.mx



- Dodić, J., Vučurović, D., Dodić, S., Grahovac, J., Popov, S., y Nedeljković, N. (2012). Kinetic modelling of batch ethanol production from sugar beet raw juice. *Applied Energy*, 99, 192-197. doi: 10.1016/j.apenergy.2012.05.016
- Dumont, H. J., Velde, I., y Dumont, S. (1975). The Dry Weight Estimate of Biomass in a Selection of Cladocera , Copepoda and Rotifera from the Plankton , Periphyton and Benthos of Continental Waters. *Oecologia (Berl.)*, 19, 75-97. Recuperado de link.springer.com
- Ecological Economics Program [EEP]. (2001). *Modelos de Crecimiento*. Florida, USA.: Environmental Systems and Public Policy. Recuperado de www.unicamp.br
- ESIN Consultora S.A. (2014). *Atlas bioenergetico del Ecuador*. Recuperado de biblioteca.olade.org
- Fajardo, E., y Sarmiento, S. (2007). *Evaluación de melaza de caña como sustrato para la producción de Saccharomyces cerevisiae* (tesis de pregrado). Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá, Colombia. Recuperado de www.javeriana.edu.co
- Farias, D., De Andrade, R., y Maugeri-Filho, F. (2014). Kinetic modeling of ethanol production by Scheffersomyces stipitis from xylose. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 172(1), 361–379. doi: 10.1007/s12010-013-0546-y. Recuperado de link.springer.com
- Fermentis. (s.f.). *Tequila: Guia sobre levaduras y fermentacion para la industria tequilera*. Recuperado de es.calameo.com
- Ferré, J. (s.f.). *El Diseño Factorial Completo 2^K*. Tarragona, España. Recuperado de www.fq.urv.cat
- Fuidio, E. (2014). *Efecto de la inoculación con levaduras secas activas en la elaboración de vinos con distintas variedades de uva tinta* (tesis de pregrado). Universidad de la Rioja, Logroño, España. Recuperado de biblioteca.unirioja.es
- García, C. (2014). *El cacao y su incidencia en la industria nacional de elaborados de cacao en el periodo 2008 – 2012* (tesis de maestría). Universidad de Guayaquil, Ecuador. Recuperado de repositorio.ug.edu.ec
- García, E. (2012). *Tratamiento por bioaumentación de un agua contaminada con hidrocarburos colectada en un terreno en rehabilitación* (tesis de maestría). Universidad Nacional Autónoma de México. Recuperado de www.ptolomeo.unam.mx



- Garduño, A., López, I., Ruíz, A., y Martínez, S. (2014). Simulación del proceso de fermentación de cerveza artesanal. *Ingeniería Investigación y Tecnología*, 15, 221-232. Recuperado de www.revistas.unam.mx
- Garzón, S., y Hernández, C. (2009). *Estudio comparativo para la producción de etanol entre Saccharomyces cerevisiae silvestre, Saccharomyces cerevisiae ATCC 9763 y Candida utilis ATCC 9950* (tesis de pregrado). Universidad Tecnológica de Pereira, Colombia. Recuperado de repositorio.utp.edu.co/dspace
- Gonzalez, D. (2011). *Cacao fino y de aroma del Ecuador "Cacao Arriba."* (tesis de pregrado). Universidad de Buenos Aires, Argentina. Recuperado de ri.agro.uba.ar
- Guevara, M., y Salazar, R. (2015). *Caracterización morfológica del fruto y la semilla de 9 clones de cacao (Theobroma cacao L.) realizado en el Centro de Desarrollo Tecnológico del INTA, El Recreo, El Rama, RAAS, en el año 2014-2015* (tesis de pregrado). Universidad Nacional Autónoma de Nicaragua, Managua. Recuperado de repositorio.unan.edu.ni
- Guillermo, J., y Macías, A. (2014). *Optimización del proceso de fermentación en la fabricación de tequila en la Empresa "Trancahuaico" Oña-Provincia del Azuay* (tesis de pregrado). Universidad de Cuenca, Ecuador. Recuperado de dspace.ucuenca.edu.ec
- Gutiérrez, B. (2011). *Estudio agromorfológico y fisicoquímico de los ecotipos de cacao cultivados en los municipios de Izalco y Nahulingo, en el Departamento de Sonsonate en El Salvador* (tesis de pregrado). Universidad Dr. Jose Matias Delgado, El Salvador. Recuperado de biblioteca.ujmd.edu.sv
- Gutiérrez, H., y Salazar, R. (2008). *Análisis y diseño de experimentos*. México, D.F: McGraw-Hill.
- Hernández, C. (2017). *Obtención de bioetanol a partir de hidrolizados de residuos de fruta* (tesis de maestría). Universidad de Oviedo, España. Recuperado de digibuo.uniovi.es
- Hernández, E. (1974). Cultivo continuo de microorganismos. *Revista de La Facultad de Agronomía*, 2(4), 95-112. Recuperado de www.produccioncientificaluz.org
- Hernández, R., Fernández, C., y Baptista, P. (2014). *Metodología de la Investigación*. Recuperado de trabajosocialudocpno.wordpress.com



- Herrera, F., y Arias, M. (2014). Producción de bioetanol por fermentación de hidrolizados hemicelulósicos de residuos de palma africana usando una cepa de *Scheffersomyces stipitis* adaptada. *DYNA*, 81(185), 204-210. doi: dx.10.15446/dyna.v81n185.38552
- Hidalgo, J. (2010). *Tratado de Enología*. Madrid, España: Mundi-Prensa Libros.
- Instituto Cubano de Investigaciones de los Derivados de la Caña de Azúcar [ICIDCA]. (2007). *Informe de la implementación de software FERMENTA 4.0 (Manual de Usuario)*. Recuperado de karin.fq.uh.cu
- Instituto de promoción de exportaciones e inversiones [PRO ECUADOR]. (2013). *Análisis del sector cacao y elaborados*. Recuperado de infocafes.com/portal
- Instituto de promoción de exportaciones e inversiones [PRO ECUADOR]. (2013). *Biocombustibles*. Recuperado de docplayer.es
- Jiménez, F., y Bonilla, M. (2012). *Aprovechamiento de mucílago y maguey de cacao (Theobroma cacao) fino de aroma para la elaboración de mermelada* (tesis de pregrado). Universidad Estatal de Bolívar, Ecuador. Recuperado de dspace.ueb.edu.ec
- Leal, I., Tarantino, G., Hernández, R., y Morán, H. (2014). Efecto de la temperatura y el pH en la fermentación del mosto de *Agave cocui*. *Multiciencias*, 14(4), 375–381. Recuperado de www.redalyc.org
- Levapan. (2017). *Levadura Levapan*. Recuperado de levapan.com.ec
- López, J. (2008). *El crecimiento económico sostenible de comunidades agrícolas a través de los biocombustibles*. Recuperado de www.wolterskluwer.es
- López, J. (2017). *Producción de bio-alcoholes, a partir de mucílago obtenido con tres tecnologías utilizadas en el beneficio ecológico del café* (tesis de maestría). Universidad de Manizales, Caldas, Colombia. Recuperado de ridum.umanizales.edu.co:8080/xmlui/
- Loray, M. (2002). *Estudio y mejoramiento genético de levaduras osmotolerantes* (tesis doctoral). Universidad de Buenos Aires, Argentina. Recuperado de digital.bl.fcen.uba.ar
- Lucero, M., y Morales, W. (2014). *Caracterización de la manteca de cacao de tres variedades Trinitario (CCN-51), Nacional (EET-103) y Forastero (IMC-67)* (tesis



- de pregrado). Universidad Técnica Estatal de Quevedo, Ecuador. Recuperado de repositorio.uteq.edu.ec
- Luzuriaga, D. (2012). *Extracción y aprovechamiento del mucílago de cacao como materia prima en la elaboración de vino* (tesis de pregrado). Universidad Tecnológica Equinoccial, Quito, Ecuador. Recuperado de repositorio.ute.edu.ec
- Macías, S., y Saavedra, M. (2017). *Determinación de la cinética de fermentación alcohólica del mucílago de cacao CCN-51 en condiciones óptimas de operación de temperatura, pH y concentración de Levadura. Caso - Zona 6* (tesis de pregrado). Universidad de Cuenca, Ecuador.
- Marroquin, A. (2011). *Estudio agromorfológico y fisicoquímico de ecotipos de cacao cultivados en los municipios de Usulután, California y Tecapán del departamento de Usulután en El Salvador* (tesis de pregrado). Universidad Dr. Jose Matias Delgado, El Salvador. Recuperado de biblioteca.ujmd.edu.sv
- Medina, P., y Lopez, A. (2011). Análisis Crítico del Diseño Factorial 2^k sobre caso aplicados. *Scientia Et Technica*, 17(47), 101-106. Recuperado de www.redalyc.org
- Montañez, J., Victoria, J., Flores, R., y Vivar, M. (2011). Fermentación de los fructanos del Agave tequilana Weber Azul por *Zymomonas mobilis* y *Saccharomyces cerevisiae* en la producción de bioetanol. *Información Tecnológica*, 22(6), 3-14. doi: 10.4067/S0718-07642011000600002. Recuperado de scielo.conicyt.cl
- Morillo, M. (2005). *Alternativas de Industrialización de cacao (Theobroma cacao L.) Nacional Fino o de Aroma en el Cantón Pangua Provincia de Cotopaxi* (tesis de pregrado). Universidad Tecnológica Equinoccial, Ecuador. Recuperado de repositorio.ute.edu.ec
- Ministerio de Industrias y Productividad [MIPRO]. (2017). *Compromiso público-privado para mantener y desarrollar Programa Ecopaís*. Quito, Ecuador: Plataforma Gubernamental de Gestión Financiera. Recuperado de www.industrias.gob.ec
- Mora, Y. (2014). *Modelación cinética de la fermentación alcohólica del zumo de pomarrosa* (tesis de pregrado). Universidad Central del Ecuador; Quito. Recuperado de www.dspace.uce.edu.ec



- Muñoz, M. (2013). Estimation of kinetic parameters of *Saccharomyces cerevisiae* in batch fermentation during different growth conditions. *ResearchGate*. Recuperado de www.researchgate.net
- Nahvi, I., Emtiazi, G., y Alkabi, L. (2002). Isolation of a flocculating *Saccharomyces cerevisiae* and investigation of its performance in the fermentation of beet molasses to ethanol. *Biomass and Bioenergy*, 23(6), 481–486. doi: 10.1016/S0961-9534(02)00070-3. Recuperado de eurekamag.com
- Norma Técnica Ecuatoriana [NTE INEN] 1489:2012 Séptima revisión. (2013). *Productos derivados del petróleo. Diésel. Requisitos*. Quito, Ecuador: INEN. Recuperado de www.controlhidrocarburos.gob.ec
- Núñez, E. (2013). *Biorreactores* (tesis de maestría). Universidad Nacional del Centro de Perú. Recuperado de es.slideshare.net
- Oлива, A. (2012). *Evaluación cinética y molecular de levaduras fructofílicas aisladas del mezcal tamaulipeco* (tesis doctoral). Universidad de Toulouse, Francia. Recuperado de ethesis.inp-toulouse.fr
- OpenStax CNX. (s.f.). *Biology: Environmental Limits to Population Growth*. Creative Commons Attribution. Recuperado de cnx.org
- Ortiz, M. (2015). *Propiedades de levaduras Saccharomyces y no Saccharomyces aisladas de ambientes naturales* (tesis doctoral). Universidad de Castilla - La Mancha, Ciudad Real. Recuperado de digital.bl.fcen.uba.ar
- Paz, I. (2010). *Diseño integral de biorreactores continuos de tanque agitado aplicados a procesos de fermentación* (tesis doctoral). Universidad Nacional de Colombia Sede Manizales. Recuperado de www.bdigital.unal.edu.co
- Petrenko, O. (2005). *Estudio de algunas características de las cepas de levaduras y de su rendimiento celular utilizando un medio de cultivo a base de suero lácteo* (tesis de maestría). Universidad de Belgrano, Buenos Aires, Argentina. Recuperado de repositorio.ub.edu.ar
- Phukoetphim, N., Salakkam, A., Laopaiboon, P., y Laopaiboon, L. (2017). Kinetic models for batch ethanol production from sweet sorghum juice under normal and high gravity fermentations: Logistic and modified Gompertz models. *Journal of Biotechnology*, 243, 69-75. doi: 10.1016/j.jbiotec.2016.12.012.



- Pigache, M., y Bainville, S. (2005). *Cacao tipo "Nacional" vs. Cacao CCN51: ¿Quién ganará el partido?*, (pp. 181-202). Recuperado de www.flacsoandes.edu.ec
- Poméon, T. (2008). Caso 5: Cacao Arriba, Ecuador. En E. Quingaía y H. Riveros (Eds.), *Calidad de los alimentos vinculada al origen y las tradiciones en América Latina: Estudios de casos* (pp. 94-95). Perú, Lima: FAO-IICA. Recuperado de www.fao.org
- Programa Mundial de Evaluación de los Recursos Hídricos [WWAP]. (2017). *Hechos y Cifras*. UNESCO. Recuperado de en.unesco.org
- Quintero, R. (1981). *Ingeniería Bioquímica: Teoría y Aplicaciones*. México, D.F.: Alhambra mexicana.
- Quizhpi, E. (2016). *Caracterización del mucílago de cacao CCN-51 mediante espectrofotometría UV-visible y absorción atómica. Caso - Zona 6* (tesis de pregrado). Universidad de Cuenca, Ecuador.
- Ramos, C., Ribeiro, D., Miguel, M., y Freitas, R. (2014). Impact of different cocoa hybrids (*Theobroma cacao L.*) and *S. cerevisiae* UFLA CA11 inoculation on microbial communities and volatile compounds of cocoa fermentation. *Food Research International*, 64, 908-918. doi:10.1016/j.foodres.2014.08.033. Recuperado de www.researchgate.net
- Raynal, C., Wardrop, F., Pillet, O., Languet, P., Suárez, C., Heras, J., Dumont, A., y Ortiz, A., (2011). Fermentación controlada mediante la inoculación secuencial de una levadura no -*Saccharomyces* y de una levadura *Saccharomyces cerevisiae* , una herramienta innovadora para el enólogo. *Revista tecnológica e higiene de los alimentos*, (428), 83-92. Recuperado de www.enoreports.com
- Reyes, M. (2009). *Aplicación del diseño experimental en el desarrollo de las prácticas internas, en el área de Operaciones Unitarias* (tesis de pregrado). Universidad de San Carlos de Guatemala. Recuperado de biblioteca.usac.edu.gt
- Ribas, M., y Díaz, M. (2004). *Simulación dinámica de un esquema de fermentación alcohólica con el Software Fermenta 3.0*. Habana, Cuba: ResearchGate GmbH. Recuperado de www.researchgate.net
- Rosero, J. (2002). *La ventaja comparativa del cacao ecuatoriano*. Quito: BCE. Recuperado de contenido.bce.fin.ec



- Salaet, S., y Roca, J. (2009). Agotamiento de los combustibles fósiles y emisiones de CO₂: Algunos posibles escenarios futuros de emisiones. *Revista Galena de Economía*, 19(1), 1-19. Recuperado de www.redalyc.org
- Sánchez, A. (2011). *Fermentación de malta empleando un sistema semicontinuo en el proceso de elaboración de cerveza* (tesis de pregrado). Universidad Tecnológica de la Mixteca, Oaxaca, México. Recuperado de biblioteca.utm.mx
- Sánchez, J. (2013). *Evaluación energética de cáscaras de cacao Nacional y CCN – 51* (tesis de maestría). Universidad de Cuenca, Ecuador. Recuperado de dspace.ucuenca.edu.ec
- Saulino, F. (2011). *Implicaciones del desarrollo de los biocombustibles para la gestión y el aprovechamiento del agua*. Santiago de Chile: CEPAL. Recuperado de repositorio.cepal.org
- Suárez, C., Garrido, N., y Guevara, C. (2016). Levadura *Saccharomyces cerevisiae* y la producción de alcohol . Revisión bibliográfica. *ICIDCA*, 50(1), 20–28. Recuperado de www.redalyc.org
- Texo, J., Betancur, C., y Duque, J. (2009). *Perspectivas generales de desarrollo de la Industria de los biocombustibles en el Uruguay* (tesis de pregrado). Universidad de la República, Montevideo, Uruguay. Recuperado de www.biodiesel.com.ar
- Torres, M. (2007). *Valoración de la calidad microbiológica del producto en proceso en una planta productora de bebidas alcohólicas* (tesis de pregrado). Pontificia Universidad Javeriana; Bogotá. Recuperado de www.javeriana.edu.co
- Ulloa, J., y Rodríguez, J. (2010). El modelo logístico: Una alternativa para el estudio del crecimiento poblacional de organismos. *REDVET: Revista Electrónica de Veterinaria*, 11(3). Recuperado de veterinaria.org
- Uribe, L. (2007). *Caracterización fisiológica de levaduras aisladas de la filósfera de Mora* (tesis de pregrado). Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá, Colombia. Recuperado de www.javeriana.edu.co
- Valdés, A., Fernandes, B., Mota, A., Aguilar, C., Ilina, A., Teixeira, J., y Ruiz, H. (2015). Cinética para la producción de bioetanol usando la levadura *Saccharomyces cerevisiae* PE-2 para su escalamiento en reactores en columna y gas-lift. Simposio llevado a cabo en el XVI Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería, Jalisco, México. Recuperado de smbb.mx



- Vallejo, C., Díaz, R., Morales, W., Velasco, R., Vera, J., y Baren, C. (2016). Utilización del mucílago de cacao, Tipo Nacional y Trinitario, en la obtención de Jalea. *ESPAMCIENCIA*, 7(1), 51-58. Recuperado de investigacion.espam.edu.ec
- Vázquez, H., y Dacosta, O. (2007). Fermentación alcohólica: Una opción para la producción de energía renovable a partir de desechos agrícolas. *Ingeniería Investigación y Tecnología*, 8(4), 249-259. Recuperado de www.revistas.unam.mx
- Vrancken, S., y Engler, A. (2014). Una Introducción a la Derivada desde la Variación y el Cambio : resultados de una investigación con estudiantes de primer año de la universidad. *Bolema*, 28(48), 449-468. doi: 10.1590/1980-4415v28n48a22. Recuperado de search.proquest.com
- Wakao, H. (2002). *Estudio de la variación del contenido de alcaloides en cacao (Theobroma cacao L.) de producción nacional durante el proceso de beneficio* (tesis de pregrado). Pontificia Universidad Católica del Ecuador, Quito. Recuperado de books.google.com.ec
- Zamora, T., Prado, A., Capataz, J., Barrera, B., y Peña, J. (2014). Demostraciones prácticas de los retos y oportunidades de la producción de bioetanol de primera y segunda generación a partir de cultivos tropicales. *Educación Química*, 25(2), 122-127. Recuperado de www.sciencedirect.com
- Zarrilli, S. (2006). El mercado emergente de biocombustibles: consecuencias normativas, comerciales y de desarrollo. Conferencia de las Naciones Unidas sobre Comercio y Desarrollo, New York y Ginebra. Recuperado de unctad.org

ANEXOS

Anexo 1. Resultados del pre – experimento realizado durante 336 horas (14 días)

En la Tabla 29 se muestran los resultados obtenidos de los promedios de pesos de muestras secas (g/L), los pesos de biomasa (g/L) y los grados Brix para cada tiempo de muestreo.

Tabla 84

Resultados del pre – experimento, en condiciones de operación de pH (4), temperatura (35°C) y concentración de levadura (3g/L)

Tiempo [h]	Promedio peso muestra seca [g/mL]	Promedio peso muestra seca [g/L]	Peso biomasa [g/L]	°Brix
0	0,1392	139,1800	0,0000	17,0
12	0,0807	80,7200	58,4600	11,0
24	0,0503	50,2733	88,9067	7,00
36	0,0477	47,6867	91,4933	6,0
48	0,0479	47,9000	91,2800	6,0
60	0,0479	47,9193	91,2607	6,0
72	0,0479	47,8800	91,3000	6,0
84	0,0478	47,7867	91,3933	6,0
96	0,0470	47,0267	92,1533	6,0
108	0,0462	46,1600	93,0200	6,0
120	0,0484	48,4133	90,7667	6,0
144	0,0502	50,1533	89,0267	6,0
168	0,0482	48,1667	91,0133	6,0
192	0,0488	48,8067	90,3733	6,0
216	0,0472	47,1867	91,9933	6,0
240	0,0488	48,8333	90,3467	6,0
264	0,0492	49,2333	89,9467	6,0
288	0,0489	48,8933	90,2867	6,0
336	0,0493	49,2933	89,8867	6,0

*Los valores de la primera fila corresponden al Blanco (sin levadura *S. cerevisiae*).

En la Figura 33 se representa – Tiempo [h] vs. Concentración de Biomasa [g/L] – con los datos expuestos en la Tabla 29.

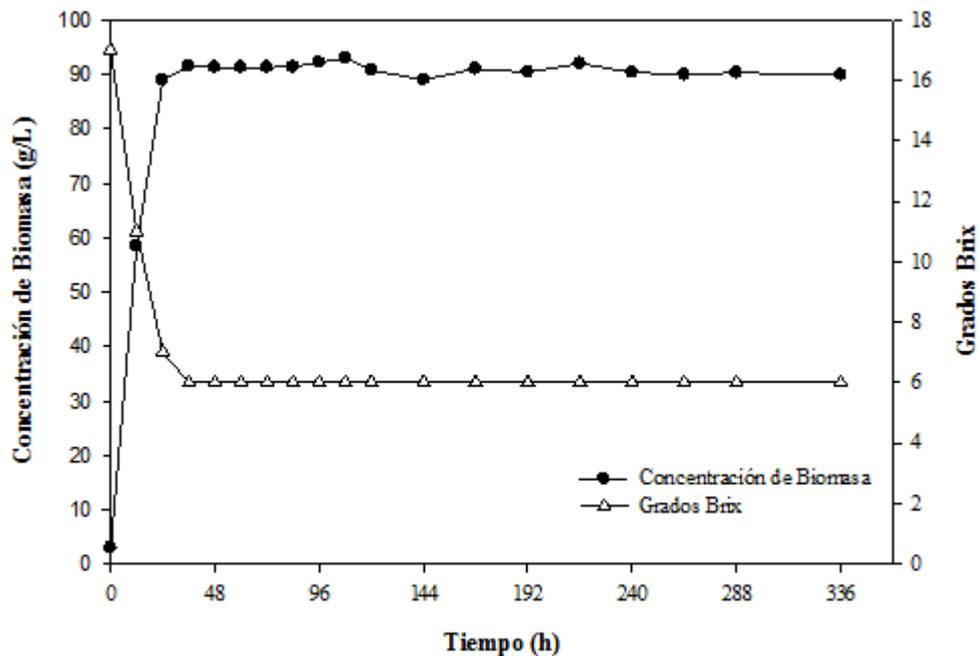


Figura 92. Curva de producción de biomasa del pre – experimento, en condiciones de operación de pH (4), temperatura (35°C) y concentración de levadura (3g/L).

En la Figura 33 se pudo evidenciar que todos los promedios siguieron una buena tendencia con respecto al crecimiento de levadura *S. cerevisiae*. Este ensayo finalizó a las 336 horas, no se observó la fase de adaptación debido al tiempo de muestreo ya que si lo hubo fue corto; el crecimiento de biomasa se dio exponencialmente aproximadamente a partir de las 0 horas, alcanzando el estado estacionario a la hora 36, con una concentración promedio de biomasa de 90,9713 g/L y 6,0 grados Brix.

Anexo 2. Resultados del método analítico peso seco

2.1. Experimento 1 de la matriz experimental.

En la Tabla 30 se muestran los resultados obtenidos en el experimento 1, así como sus respectivos porcentajes de error, los cuales fueron calculados empleando la Ecuación 12.

Tabla 87

Resultados obtenidos a partir del método analítico peso seco con sus respectivos porcentajes de error. Experimento 1 de la matriz experimental

Tiempo [h]	Peso muestra seca [g/mL]			Porcentaje de error experimental [%]		
	A ⁺	B ⁺⁺	C ⁺⁺⁺	A ⁺	B ⁺⁺	C ⁺⁺⁺
0,0*	0,1351	0,1340	0,1318	1,13	0,25	1,38
0,0	0,1341	0,1323	0,1335	0,60	0,75	0,15
6,0	0,1318	0,1312	0,1334	0,25	0,73	0,98
12,0	0,1252	0,1246	0,1259	0,01	0,50	0,51
18,0	0,1195	0,1198	0,1187	0,13	0,36	0,49
24,0	0,1126	0,1130	0,1126	0,13	0,21	0,08
30,0	0,1086	0,1090	0,1069	0,39	0,78	1,18
34,5	0,1012	0,0986	0,0979	1,98	0,66	1,32
46,5	0,0905	0,0913	0,0920	0,85	0,07	0,77
58,5	0,0798	0,0803	0,0808	0,64	0,03	0,61
70,5	0,0694	0,0692	0,0688	0,39	0,10	0,48
82,5	0,0592	0,0587	0,0588	0,53	0,32	0,22
94,5	0,0520	0,0520	0,0533	0,81	0,89	1,70
106,5	0,0483	0,0488	0,0479	0,01	0,88	0,90
118,5	0,0466	0,0464	0,0463	0,30	0,04	0,34
166,5	0,0444	0,0445	0,0436	0,56	0,78	1,34

Condiciones de operación: pH (4), temperatura (25°C) y concentración de levadura (1g/L).

*Los valores de la primera fila corresponden al Blanco (sin levadura *S. cerevisiae*). ⁺Primera muestra. ⁺⁺Segunda muestra. ⁺⁺⁺Tercera muestra.

En el experimento 1 de la matriz experimental no se eliminó ningún resultado de peso seco, ya que todos los datos de encontraron dentro del rango de aceptación 5%, es decir todos fueron considerados para realizar el promedio de muestra seca (g/mL) y así realizar posteriores análisis.

En la Tabla 31 se muestran los resultados de los promedios de pesos de muestras secas (g/L), los pesos de biomasa (g/L) y los grados Brix para cada tiempo de muestreo obtenidos en el experimento 1; y en la Figura 34 se representa – Tiempo [h] vs. Concentración de Biomasa [g/L] – con los datos expuestos en la misma tabla, donde se puede evidenciar que todos los promedios siguieron una buena tendencia con respecto al crecimiento de levadura *S. cerevisiae*. Este ensayo finalizó a las 166,5 horas, se observó la fase de adaptación hasta la hora 6; el crecimiento de biomasa se dio exponencialmente a partir de las 6 horas, alcanzando el estado estacionario a la hora 166,5 con una concentración de biomasa de 89,4533 g/L y 6,0 grados Brix.

Este experimento no se realizó hasta obtener tres valores de concentración de biomasa en el estado estacionario debido a que el tiempo de muestreo se hubiese alargado demasiado, siendo innecesario el gasto de recursos, ya que con un solo valor se tuvo un aproximado de la concentración máxima de biomasa.

Tabla 90

Concentración de biomasa a partir del método analítico peso seco. Experimento 1 de la matriz experimental

Tiempo [h]	Promedio peso muestra seca [g/mL]	Promedio peso muestra seca [g/L]	Peso biomasa [g/L]	°Brix
0,0*	0,1336	133,6267	0,0000	17,0
0,0	0,1333	133,3000	0,3333	17,0
6,0	0,1321	132,1267	1,5000	16,0
12,0	0,1252	125,2467	8,3800	15,5
18,0	0,1193	119,3267	14,3000	15,0
24,0	0,1127	112,7267	20,9000	14,5
30,0	0,1082	108,1533	25,4733	13,5
34,5	0,0993	99,2533	34,3733	13,5
46,5	0,0913	91,2533	42,3733	12,5
58,5	0,0803	80,2733	53,3533	11,0
70,5	0,0691	69,1333	64,4933	10,0
82,5	0,0589	58,9067	74,7200	9,0
94,5	0,0524	52,4267	81,2000	8,0
106,5	0,0483	48,3333	85,2933	7,5
118,5	0,0464	46,4200	87,2067	7,0
166,5	0,0442	44,1733	89,4533	6,0

Condiciones de operación: pH (4), temperatura (25°C) y concentración de levadura (1g/L).

*Los valores de la primera fila corresponden al Blanco (sin levadura *S. cerevisiae*).

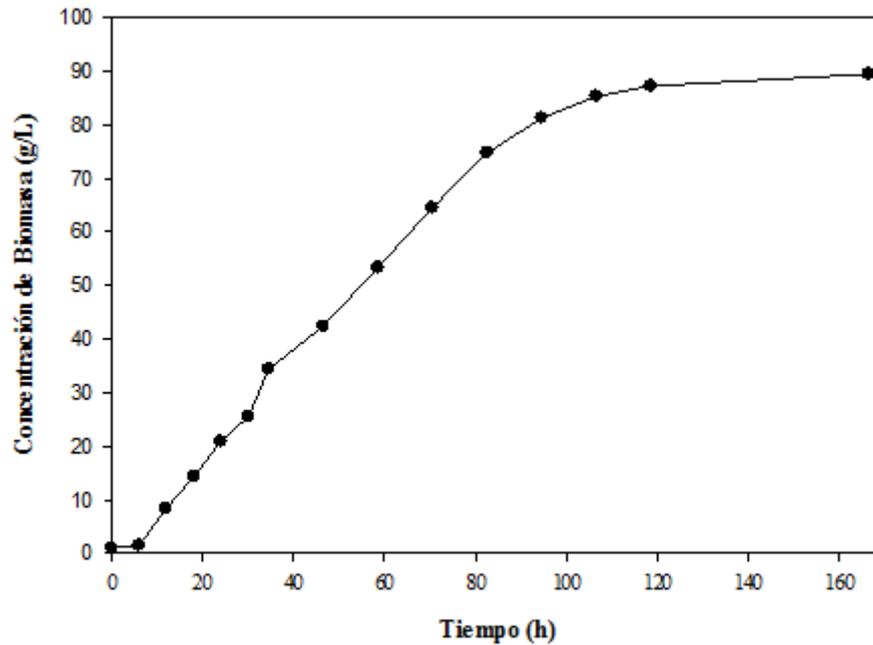


Figura 95. Curva de crecimiento biomasa en fermentación discontinua con las condiciones de operación de pH (4), temperatura (25°C) y concentración de levadura (1g/L) aplicando el método analítico de peso seco.

2.2. Experimento 2 de la matriz experimental.

En la Tabla 32 se muestran los resultados obtenidos en el experimento 2, así como sus respectivos porcentajes de error, los cuales fueron calculados empleando la Ecuación 12.

En el experimento 2 de la matriz experimental no se eliminó ningún resultado de peso seco, ya que todos los datos de encontraron dentro del rango de aceptación 5%, es decir todos fueron considerados para realizar el promedio de muestra seca (g/mL) y así realizar posteriores análisis.

Tabla 93

Resultados obtenidos a partir del método analítico peso seco con sus respectivos porcentajes de error. Experimento 2 de la matriz experimental

Tiempo [h]	Peso muestra seca [g/mL]			Porcentaje de error experimental [%]		
	A ⁺	B ⁺⁺	C ⁺⁺⁺	A ⁺	B ⁺⁺	C ⁺⁺⁺
0*	0,1310	0,1301	0,1310	0,21	0,46	0,24
0	0,1301	0,1299	0,1311	0,20	0,36	0,56
6	0,1197	0,1202	0,1227	0,96	0,55	1,51
12	0,1116	0,1120	0,1045	2,06	2,43	4,49
18	0,0991	0,0996	0,0992	0,21	0,30	0,09
24	0,0882	0,0871	0,0865	1,08	0,20	0,89
30	0,0748	0,0748	0,0749	0,02	0,10	0,12
33	0,0682	0,0676	0,0680	0,42	0,55	0,13
45	0,0487	0,0483	0,0470	1,56	0,60	2,15
58	0,0413	0,0414	0,0410	0,23	0,32	0,55
70	0,0401	0,0399	0,0398	0,42	0,08	0,33
82	0,0398	0,0396	0,0388	0,91	0,61	1,52

Condiciones de operación: pH (4), temperatura (35°C) y concentración de levadura (1g/L).

*Los valores de la primera fila corresponden al Blanco (sin levadura *S. cerevisiae*). ⁺Primera muestra. ⁺⁺Segunda muestra. ⁺⁺⁺Tercera muestra.

En la Tabla 33 se muestran los resultados de los promedios de pesos de muestras secas (g/L), los pesos de biomasa (g/L) y los grados Brix para cada tiempo de muestreo obtenidos en el experimento 2; y en la Figura 35 se representa – Tiempo [h] vs. Concentración de Biomasa [g/L] – con los datos expuestos en la misma tabla, donde se puede evidenciar que todos los promedios siguieron una buena tendencia con respecto al crecimiento de levadura *S. cerevisiae*. Este ensayo finalizó a las 82 horas, no se observó la fase de adaptación debido al tiempo de muestreo y si lo hubo fue corto; el crecimiento de biomasa se dio exponencialmente aproximadamente a partir de las 0 horas, alcanzando el estado estacionario a la hora 58, con una concentración promedio de biomasa de 90,5267 g/L y 6,0 grados Brix.

Tabla 96

Concentración de biomasa a partir del método analítico peso seco. Experimento 2 de la matriz experimental

Tiempo [h]	Promedio peso muestra seca [g/mL]	Promedio peso muestra seca [g/L]	Peso biomasa [g/L]	°Brix
0*	0,1307	130,7200	0,0000	17,0
0	0,1304	130,3667	0,3333	17,0
6	0,1209	120,8600	9,8600	15,0
12	0,1094	109,3867	21,3333	14,0
18	0,0993	99,3267	31,3933	13,0
24	0,0873	87,2933	43,4267	11,5
30	0,0749	74,8533	55,8667	10,5
33	0,0680	67,9533	62,7667	9,5
45	0,0480	47,9933	82,7267	7,5
58	0,0412	41,2467	89,4733	6,0
70	0,0399	39,9333	90,7867	6,0
82	0,0394	39,4000	91,3200	6,0

Condiciones de operación: pH (4), temperatura (35°C) y concentración de levadura (1g/L).

*Los valores de la primera fila corresponden al Blanco (sin levadura *S. cerevisiae*).

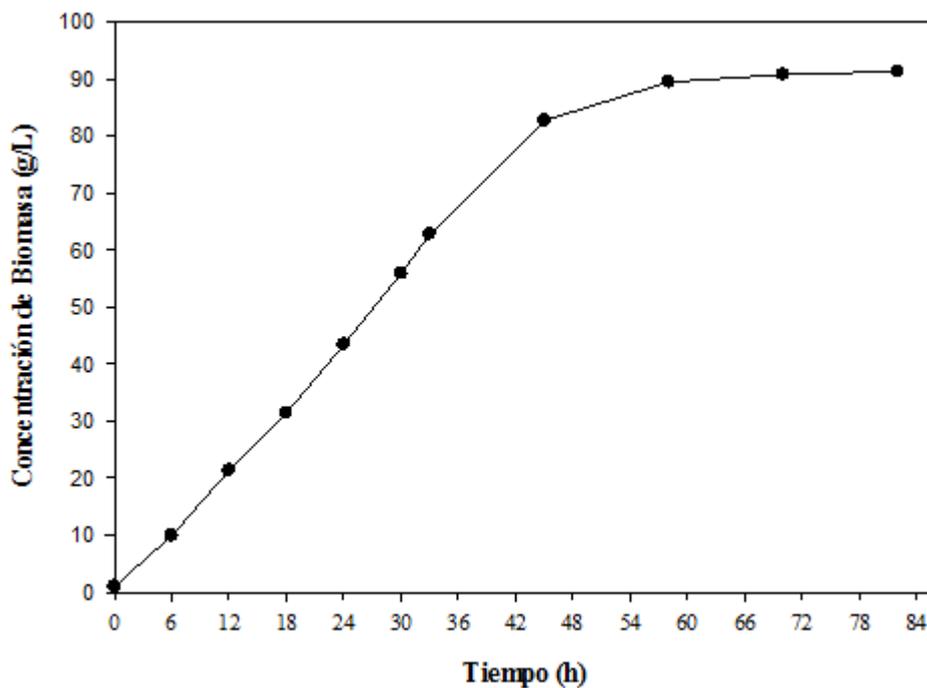


Figura 98. Curva de crecimiento de biomasa en fermentación discontinua con las condiciones de operación de pH (4), temperatura (35°C) y concentración de levadura (1g/L) aplicando el método analítico de peso seco.

2.3. Experimento 3 de la matriz experimental.

En la Tabla 34 se muestran los resultados obtenidos en el experimento 3, así como sus respectivos porcentajes de error, los cuales fueron calculados empleando la Ecuación 12.

Tabla 99

Resultados obtenidos a partir del método analítico peso seco con sus respectivos porcentajes de error. Experimento 3 de la matriz experimental

Tiempo [h]	Peso muestra seca [g/mL]			Porcentaje de error experimental [%]		
	A ⁺	B ⁺⁺	C ⁺⁺⁺	A ⁺	B ⁺⁺	C ⁺⁺⁺
0,0*	0,1376	0,1323	0,1360	1,72	2,21	0,49
0,0	0,1331	0,1349	0,1369	1,38	0,05	1,43
6,0	0,1289	0,1362	0,1355	3,49	2,03	1,46
12,0	0,1189	0,1183	0,1188	0,17	0,32	0,15
18,0	0,1085	0,1074	0,1058	1,22	0,16	1,37
24,0	0,0933	0,0945	0,0931	0,33	0,89	0,56
30,0	0,0793	0,0744	0,0761	3,51	2,84	0,67
34,5	0,0702	0,0739	0,0683	0,89	4,42	3,52
46,5	0,0519	0,0574	0,0567	6,27	3,75	2,52
58,5	0,0532	0,0531	0,0533	0,00	0,19	0,19
70,5	0,0507	0,0507	0,0503	0,23	0,28	0,51
82,5	0,0503	0,0509	0,0515	1,24	0,01	1,23
94,5	0,0509	0,0509	0,0504	0,39	0,28	0,67

Condiciones de operación: pH (5), temperatura (25°C) y concentración de levadura (1g/L).

*Los valores de la primera fila corresponden al Blanco (sin levadura *S. cerevisiae*). ⁺Primera muestra. ⁺⁺Segunda muestra. ⁺⁺⁺Tercera muestra.

En el experimento 3 de la matriz experimental se eliminó el resultado de peso seco de la muestra A (0,0519 g/mL a la hora 46,5), con un error de 6,27%. Este resultado no se consideró para realizar el promedio respectivo ya que superó el porcentaje de aceptación 5%. Las causas por las cuales estos dos resultados de pesos secos presentaron dichos porcentajes de error pudieron deberse a errores humanos, o pérdidas de la muestra ya que se observó una pequeña cantidad de la misma derramada fuera del tubo que la contenía. Todos los demás datos de pesos secos si fueron considerados para realizar el promedio (g/mL) y así realizar posteriores análisis.

En la Tabla 35 se muestran los resultados de los promedios de pesos de muestras secas (g/L), los pesos de biomasa (g/L) y los grados Brix para cada tiempo de muestreo obtenidos en el experimento 3; y en la Figura 36 se representa – Tiempo [h] vs. Concentración de Biomasa [g/L] – con los datos expuestos en la misma tabla, donde se puede evidenciar que todos los promedios siguieron una buena tendencia con respecto al crecimiento de levadura *S. cerevisiae*. Este ensayo finalizó a las 94,5 horas, se observó la fase de adaptación hasta la hora 6; el crecimiento de biomasa se dio exponencialmente a partir de las 6 horas, alcanzando el estado estacionario a la hora 70,5 con una concentración promedio de biomasa de 84,5556 g/L y 6,0 grados Brix.

Tabla 102

Concentración de biomasa a partir del método analítico peso seco. Experimento 3 de la matriz experimental

Tiempo [h]	Promedio peso muestra seca [g/mL]	Promedio peso muestra seca [g/L]	Peso biomasa [g/L]	°Brix
0,0*	0,1353	135,2933	0,0000	17,0
0,0	0,1350	134,9667	0,3333	17,0
6,0	0,1335	133,5133	1,7800	16,5
12,0	0,1187	118,6600	16,6333	15,0
18,0	0,1072	107,2333	28,0600	13,5
24,0	0,0936	93,6467	41,6467	12,5
30,0	0,0766	76,6133	58,6800	12,5
34,5	0,0708	70,8133	64,4800	10,0
46,5	0,0571	57,0600	78,2333	7,5
58,5	0,0532	53,1800	82,1133	6,5
70,5	0,0506	50,6000	84,6933	6,0
82,5	0,0509	50,8933	84,4000	6,0
94,5	0,0507	50,7200	84,5733	6,0

Condiciones de operación: pH (5), temperatura (25°C) y concentración de levadura (1g/L).

*Los valores de la primera fila corresponden al Blanco (sin levadura *S. cerevisiae*).

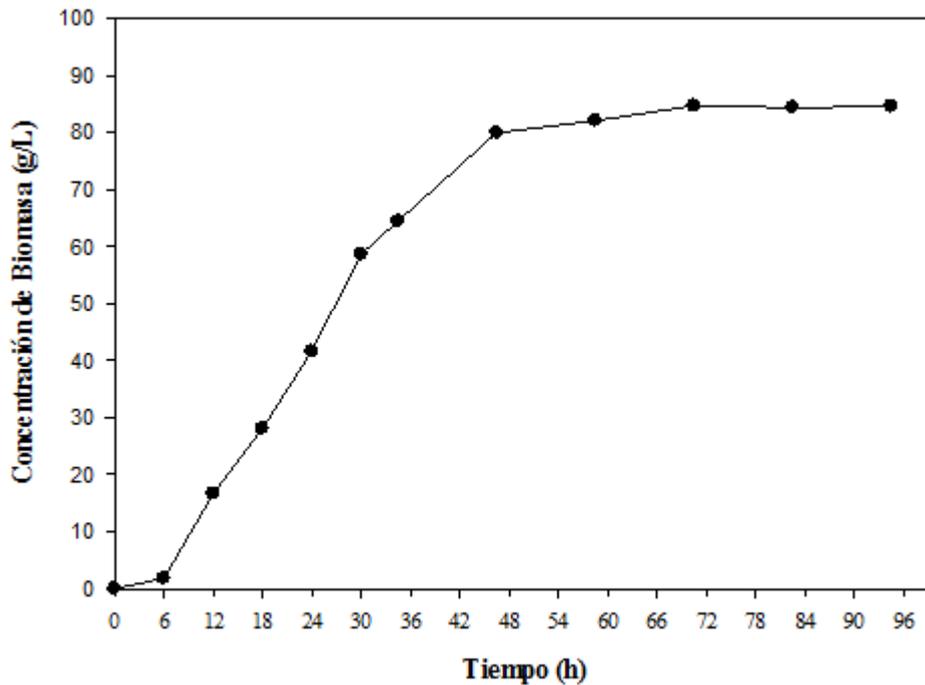


Figura 101. Curva de crecimiento de biomasa en fermentación discontinua con las condiciones de operación de pH (5), temperatura (25°C) y concentración de levadura (1g/L) aplicando el método analítico de peso seco.

2.4. Experimento 4 de la matriz experimental.

En la Tabla 36 se muestran los resultados obtenidos en el experimento 4, así como sus respectivos porcentajes de error, los cuales fueron calculados empleando la Ecuación 12.

En el experimento 4 de la matriz experimental no se eliminó ningún resultado de peso seco, ya que todos los datos de encontraron dentro del rango de aceptación 5%, es decir todos fueron considerados para realizar el promedio de muestra seca (g/mL) y así realizar posteriores análisis.

Tabla 105

Resultados obtenidos a partir del método analítico peso seco con sus respectivos porcentajes de error. Experimento 4 de la matriz experimental

Tiempo [h]	Peso muestra seca [g/mL]			Porcentaje de error experimental [%]		
	A ⁺	B ⁺⁺	C ⁺⁺⁺	A ⁺	B ⁺⁺	C ⁺⁺⁺
0,0*	0,1322	0,1337	0,1245	1,58	2,73	4,32
0,0	0,1299	0,1297	0,1298	0,08	0,08	0,00
6,0	0,1283	0,1285	0,1301	0,52	0,34	0,86
12,0	0,1150	0,1144	0,1111	1,32	0,82	2,14
18,0	0,1039	0,1040	0,1018	0,63	0,73	1,37
24,0	0,0865	0,0872	0,0875	0,62	0,13	0,49
30,0	0,0724	0,0725	0,0724	0,08	0,11	0,02
34,5	0,0587	0,0573	0,0597	0,28	2,13	1,85
48,0	0,0431	0,0432	0,0441	0,95	0,53	1,48
57,5	0,0450	0,0450	0,0443	0,52	0,52	1,00
72,0	0,0441	0,0438	0,0438	0,44	0,19	0,24

Condiciones de operación: pH (5), temperatura (35°C) y concentración de levadura (1g/L).

*Los valores de la primera fila corresponden al Blanco (sin levadura *S. cerevisiae*). ⁺Primera muestra. ⁺⁺Segunda muestra. ⁺⁺⁺Tercera muestra.

En la Tabla 37 se muestran los resultados de los promedios de pesos de muestras secas (g/L), los pesos de biomasa (g/L) y los grados Brix para cada tiempo de muestreo obtenidos en el experimento 4; y en la Figura 37 se representa – Tiempo [h] vs. Concentración de Biomasa [g/L] – con los datos expuestos en la misma tabla, donde se puede evidenciar que todos los promedios siguieron una buena tendencia con respecto al crecimiento de levadura *S. cerevisiae*. Este ensayo finalizó a las 72 horas, se observó la fase de adaptación hasta la hora 6; el crecimiento de biomasa se dio exponencialmente a partir de las 6 horas, alcanzando el estado estacionario a la hora 48 con una concentración promedio de biomasa de 86,1311 g/L y 6,0 grados Brix.

Tabla 108

Concentración de biomasa a partir del método analítico peso seco. Experimento 4 de la matriz experimental

Tiempo [h]	Promedio peso muestra seca [g/mL]	Promedio peso muestra seca [g/L]	Peso biomasa [g/L]	°Brix
0,0*	0,1302	130,1733	0,0000	17,0
0,0	0,1298	129,8000	0,3333	17,0
6,0	0,1290	128,9800	1,1933	15,5
12,0	0,1135	113,5000	16,6733	14,0
18,0	0,1033	103,2600	26,9133	12,5
24,0	0,0871	87,0867	43,0867	11,5
30,0	0,0725	72,4600	57,7133	10,0
34,5	0,0586	58,5733	71,6000	8,0
48,0	0,0435	43,4733	86,7000	6,0
57,5	0,0448	44,7867	85,3867	6,0
72,0	0,0439	43,8667	86,3067	6,0

Condiciones de operación: pH (5), temperatura (35°C) y concentración de levadura (1g/L).

*Los valores de la primera fila corresponden al Blanco (sin levadura *S. cerevisiae*).

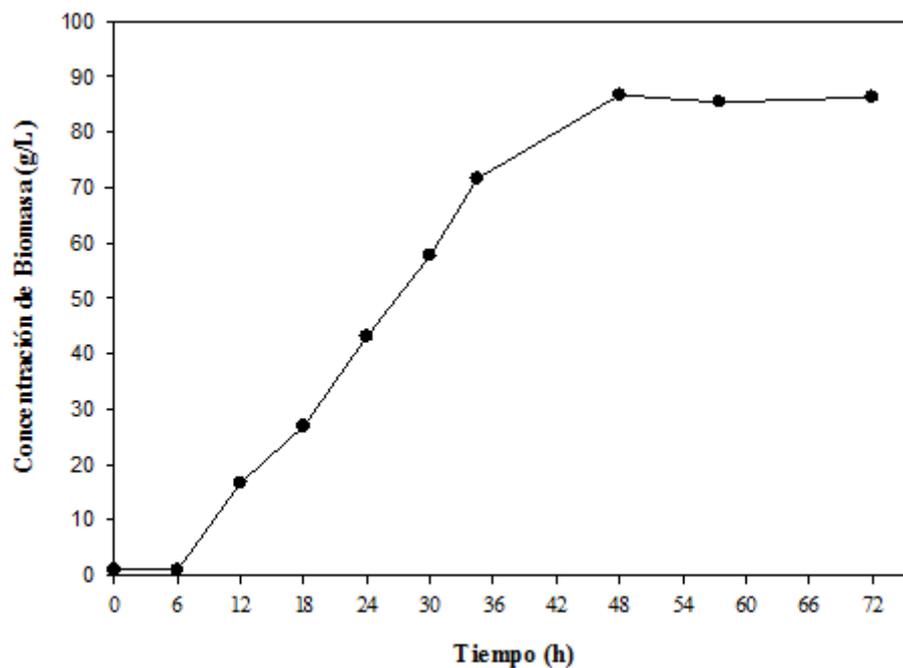


Figura 104. Curva de crecimiento de biomasa en fermentación discontinua con las condiciones de operación de pH (5), temperatura (35°C) y concentración de levadura (1g/L) aplicando el método analítico de peso seco.

2.5. Experimento 5 de la matriz experimental.

En la Tabla 38 se muestran los resultados obtenidos en el experimento 5, así como sus respectivos porcentajes de error, los cuales fueron calculados empleando la Ecuación 12.

Tabla 111

Resultados obtenidos a partir del método analítico peso seco con sus respectivos porcentajes de error. Experimento 5 de la matriz experimental

Tiempo [h]	Peso muestra seca [g/mL]			Porcentaje de error experimental [%]		
	A ⁺	B ⁺⁺	C ⁺⁺⁺	A ⁺	B ⁺⁺	C ⁺⁺⁺
0,00*	0,1346	0,1352	0,1341	0,01	0,42	0,41
0,00	0,1353	0,1349	0,1327	0,74	0,45	1,19
6,00	0,1287	0,1279	0,1282	0,31	0,27	0,04
12,00	0,1206	0,1213	0,1215	0,45	0,12	0,32
18,00	0,1140	0,1145	0,1136	0,05	0,40	0,36
24,00	0,1057	0,1065	0,1073	0,76	0,03	0,79
30,00	0,0983	0,0996	0,1001	1,03	0,27	0,75
33,75	0,0883	0,0883	0,0883	0,02	0,05	0,02
47,25	0,0739	0,0741	0,0735	0,08	0,35	0,43
56,75	0,0629	0,0628	0,0622	0,47	0,28	0,76
71,42	0,0477	0,0557	0,0476	5,18	10,57	5,38
80,75	0,0427	0,0421	0,0432	0,03	1,37	1,34
95,42	0,0427	0,0422	0,0426	0,53	0,69	0,15
103,75	0,0422	0,0478	0,0431	4,94	7,72	2,77

Condiciones de operación: pH (4), temperatura (25°C) y concentración de levadura (1g/L).

*Los valores de la primera fila corresponden al Blanco (sin levadura *S. cerevisiae*). ⁺Primera muestra. ⁺⁺Segunda muestra. ⁺⁺⁺Tercera muestra.

En el experimento 5 de la matriz experimental se eliminaron los resultados de los pesos secos de las muestras B (0,0557 g/mL a la hora 71,42) y B (0,0478 g/mL a la hora 103,75), con un error del 10,57% y 7,72%; respectivamente. Estos resultados no se consideraron para realizar el promedio respectivo ya que superaron el porcentaje de aceptación 5,5%. Las causas por las cuales estos dos resultados de pesos secos presentaron dichos porcentajes de error pudieron deberse a errores humanos. Todos los demás datos de pesos secos si fueron considerados para realizar el promedio (g/mL) y así realizar posteriores análisis.

En la Tabla 39 se muestran los resultados de los promedios de pesos de muestras secas (g/L), los pesos de biomasa (g/L) y los grados Brix para cada tiempo de muestreo obtenidos en el experimento 5; y en la Figura 38 se representa – Tiempo [h] vs. Concentración de Biomasa [g/L] – con los datos expuestos en la misma tabla, donde se puede evidenciar que todos los promedios siguieron una buena tendencia con respecto al crecimiento de levadura *S. cerevisiae*. Este ensayo finalizó a las 103,75 horas, no se observó la fase de adaptación debido al tiempo de muestreo y si lo hubo fue corto; el crecimiento de biomasa se dio exponencialmente aproximadamente a partir de la hora 6, alcanzando el estado estacionario a la hora 80,75 con una concentración promedio de biomasa de 92,0067 g/L y 6,0 grados Brix.

Tabla 114

Concentración de biomasa a partir del método analítico peso seco. Experimento 5 de la matriz experimental

Tiempo [h]	Promedio peso muestra seca [g/mL]	Promedio peso muestra seca [g/L]	Peso biomasa [g/L]	°Brix
0,00*	0,1346	134,6133	0,0000	17,0
0,00	0,1343	134,3000	0,3333	17,0
6,00	0,1283	128,2933	6,3200	16,0
12,00	0,1211	121,1467	13,4667	15,0
18,00	0,1140	114,0333	20,5800	14,5
24,00	0,1065	106,4933	28,1200	13,5
30,00	0,0993	99,3067	35,3067	12,5
33,75	0,0883	88,3200	46,2933	12,0
47,25	0,0738	73,8000	60,8133	10,5
56,75	0,0626	62,6400	71,9733	9,5
71,42	0,0477	47,6900	86,9233	7,5
80,75	0,0427	42,6667	91,9467	6,0
95,42	0,0425	42,4933	92,1200	6,0
103,75	0,0427	42,6600	91,9533	6,0

Condiciones de operación: pH (4), temperatura (25°C) y concentración de levadura (1g/L).

*Los valores de la primera fila corresponden al Blanco (sin levadura *S. cerevisiae*).

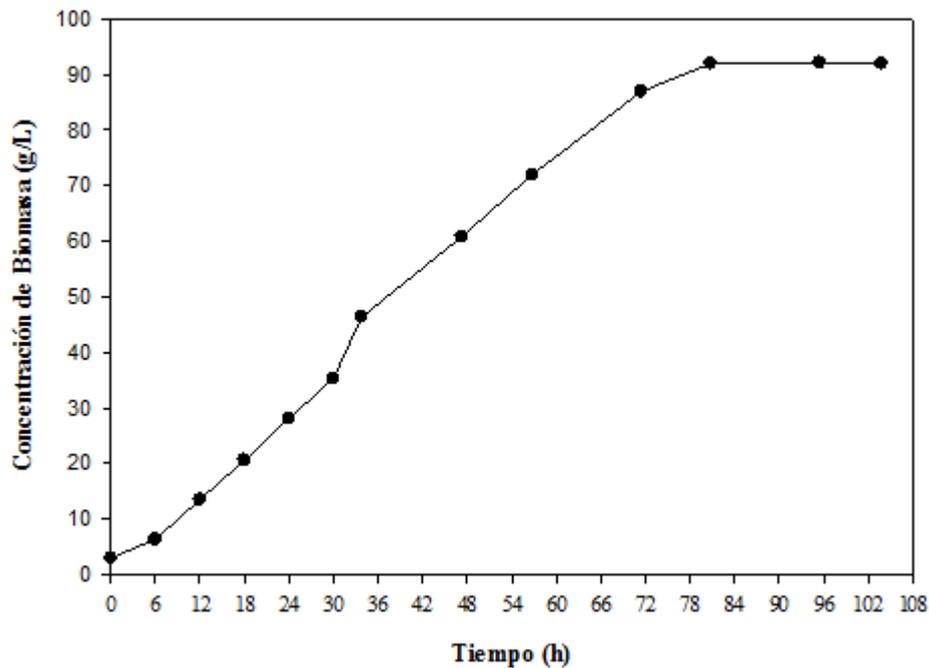


Figura 107. Curva de crecimiento de biomasa en fermentación discontinua con las condiciones de operación de pH (4), temperatura (25°C) y concentración de levadura (3g/L) aplicando el método analítico de peso seco.

2.6. Réplica del experimento 6 de la matriz experimental.

En la Tabla 40 se muestran los resultados obtenidos en la réplica del experimento 6, así como sus respectivos porcentajes de error, los cuales fueron calculados empleando la Ecuación 12.

En la réplica del experimento 6 de la matriz experimental no se eliminó ningún resultado de peso seco, ya que todos los datos de encontraron dentro del rango de aceptación 5%, es decir todos fueron considerados para realizar el promedio de muestra seca (g/mL) y así realizar posteriores análisis.

Tabla 117

Resultados obtenidos a partir del método analítico peso seco con sus respectivos porcentajes de error. Experimento 6 de la matriz experimental: Réplica

Tiempo [h]	Peso muestra seca [g/mL]			Porcentaje de error experimental [%]		
	A ⁺	B ⁺⁺	C ⁺⁺⁺	A ⁺	B ⁺⁺	C ⁺⁺⁺
0*	0,1411	0,1383	0,1396	1,00	0,95	0,06
0	0,1399	0,1379	0,1389	0,72	0,72	0,00
6	0,1221	0,1184	0,1199	1,65	1,45	0,20
12	0,1068	0,0987	0,1009	4,57	3,36	1,21
18	0,1068	0,0987	0,1009	1,95	1,80	0,15
24	0,0864	0,0832	0,0846	0,93	0,79	1,72
30	0,0579	0,0578	0,0564	1,21	0,59	0,63
36	0,0506	0,0497	0,0496	0,46	0,33	0,12
42	0,0485	0,0481	0,0482	2,43	0,15	2,58
48	0,0471	0,0482	0,0496	0,67	0,48	0,19

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

*Los valores de la primera fila corresponden al Blanco (sin levadura *S. cerevisiae*). ⁺Primera muestra. ⁺⁺Segunda muestra. ⁺⁺⁺Tercera muestra.

En la Tabla 41 se muestran los resultados de los promedios de pesos de muestras secas (g/L), los pesos de biomasa (g/L) y los grados Brix para cada tiempo de muestreo obtenidos en la réplica del experimento 6; y en la Figura 39 se representa – Tiempo [h] vs. Concentración de Biomasa [g/L] – con los datos expuestos en la misma tabla, donde se puede evidenciar que todos los promedios siguieron una buena tendencia con respecto al crecimiento de levadura *S. cerevisiae*. Este ensayo finalizó a las 48 horas, no se observó la fase de adaptación debido al tiempo de muestreo y si lo hubo fue corto; el crecimiento de biomasa se dio exponencialmente aproximadamente a partir de la hora 0, alcanzando el estado estacionario a la hora 36 con una concentración promedio de biomasa de 91,3333 g/L y 6,0 grados Brix.

Tabla 120

Concentración de biomasa a partir del método analítico peso seco. Experimento 6 de la matriz experimental: Réplica

Tiempo [h]	Promedio peso muestra seca [g/mL]	Promedio peso muestra seca [g/L]	peso biomasa [g/L]	°Brix
0*	0,1397	139,6600	0,0000	17,0
0	0,1389	138,9000	0,7667	17,0
6	0,1201	120,1400	19,5200	14,5
12	0,1022	102,1733	37,4867	9,0
18	0,0847	84,7067	54,9533	7,5
24	0,0574	57,3667	82,2933	7,0
30	0,0500	49,9533	89,7067	6,5
36	0,0482	48,2400	91,4200	6,0
42	0,0483	48,3133	91,3467	6,0
48	0,0484	48,4267	91,2333	6,0

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

*Los valores de la primera fila corresponden al Blanco (sin levadura *S. cerevisiae*).

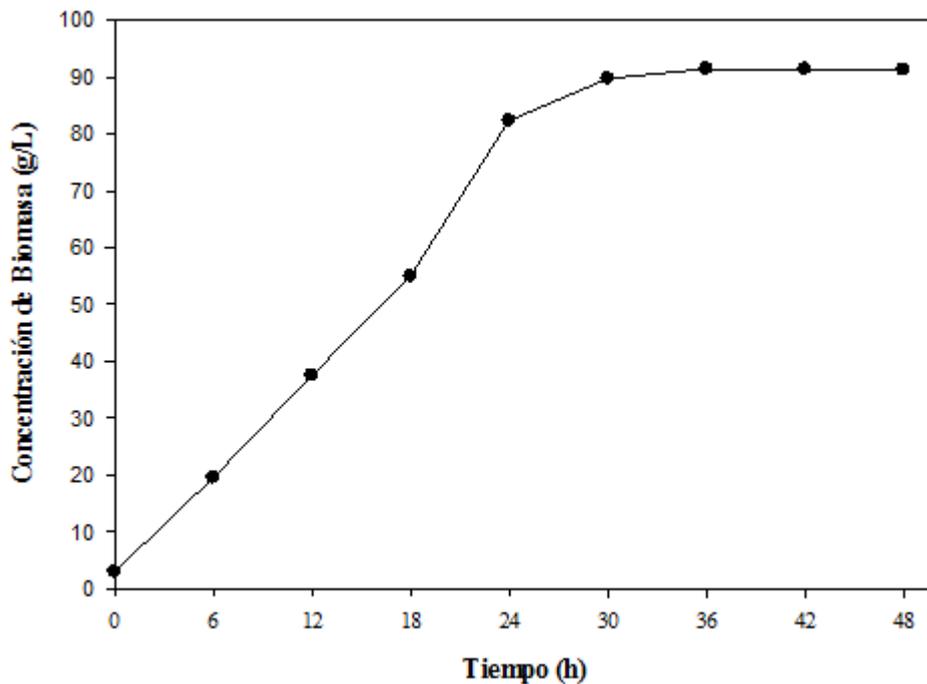


Figura 110. Curva de crecimiento de biomasa en fermentación discontinua con las condiciones de operación de pH (4), temperatura (35°C) y concentración de levadura (3g/L) aplicando el método analítico de peso seco.

2.7. Experimento 7 de la matriz experimental.

En la Tabla 42 se muestran los resultados obtenidos en el experimento 7, así como sus respectivos porcentajes de error, los cuales fueron calculados empleando la Ecuación 12.

Tabla 123

Resultados obtenidos a partir del método analítico peso seco con sus respectivos porcentajes de error. Experimento 7 de la matriz experimental

Tiempo [h]	Peso muestra seca [g/mL]			Porcentaje de error experimental [%]		
	A ⁺	B ⁺⁺	C ⁺⁺⁺	A ⁺	B ⁺⁺	C ⁺⁺⁺
0*	0,1247	0,1243	0,1251	0,02	0,29	0,27
0	0,1252	0,1218	0,1248	1,02	1,72	0,70
6	0,1179	0,1168	0,1167	0,63	0,27	0,35
12	0,1055	0,1060	0,1046	0,15	0,60	0,75
18	0,0990	0,0995	0,0977	0,27	0,77	1,04
24	0,0883	0,0896	0,0891	0,81	0,68	0,12
30	0,0785	0,0783	0,0787	0,00	0,23	0,24
35	0,0698	0,0698	0,0698	0,01	0,04	0,03
48	0,0598	0,0602	0,0593	0,01	0,78	0,79
59	0,0574	0,0580	0,0574	0,34	0,69	0,34
72	0,0558	0,0578	0,0568	1,67	1,73	0,05
83	0,0565	0,0582	0,0571	1,33	1,66	0,32

Condiciones de operación: pH (5), temperatura (25°C) y concentración de levadura (3g/L).

*Los valores de la primera fila corresponden al Blanco (sin levadura *S. cerevisiae*). +Primera muestra. ++Segunda muestra. +++Tercera muestra.

En el experimento 7 de la matriz experimental no se eliminó ningún resultado de peso seco, ya que todos los datos de encontraron dentro del rango de aceptación 5%, es decir todos fueron considerados para realizar el promedio de muestra seca (g/mL) y así realizar posteriores análisis.

En la Tabla 43 se muestran los resultados de los promedios de pesos de muestras secas (g/L), los pesos de biomasa (g/L) y los grados Brix para cada tiempo de muestreo obtenidos en el experimento 7; y en la Figura 40 se representa – Tiempo [h] vs. Concentración de Biomasa [g/L] – con los datos expuestos en la misma tabla, donde se puede evidenciar que todos los promedios siguieron una buena tendencia con respecto al crecimiento de levadura *S. cerevisiae*. Este ensayo finalizó a las 83 horas, no se observó

la fase de adaptación debido al tiempo de muestreo y si lo hubo fue corto; el crecimiento de biomasa se dio exponencialmente a partir de las 6 horas, alcanzando el estado estacionario a la hora 59 con una concentración promedio de biomasa de 67,4933 g/L y 7,0 grados Brix.

Tabla 126

Concentración de biomasa a partir del método analítico peso seco. Experimento 7 de la matriz experimental

Tiempo [h]	Promedio peso muestra seca [g/mL]	Promedio peso muestra seca [g/L]	Peso biomasa [g/L]	°Brix
0*	0,1247	124,7133	0,0000	17,0
0	0,1239	123,9333	0,7667	17,0
6	0,1171	117,1200	7,5933	15,0
12	0,1054	105,3800	19,3333	14,0
18	0,0987	98,7333	25,9800	13,0
24	0,0890	89,0067	35,7067	12,0
30	0,0785	78,5267	46,1867	11,0
35	0,0698	69,8067	54,9067	10,0
48	0,0598	59,7533	64,9600	8,0
59	0,0576	57,6200	67,0933	7,0
72	0,0568	56,7933	67,9200	7,0
83	0,0572	57,2467	67,4667	7,0

Condiciones de operación: pH (5), temperatura (25°C) y concentración de levadura (3g/L).

*Los valores de la primera fila corresponden al Blanco (sin levadura *S. cerevisiae*).

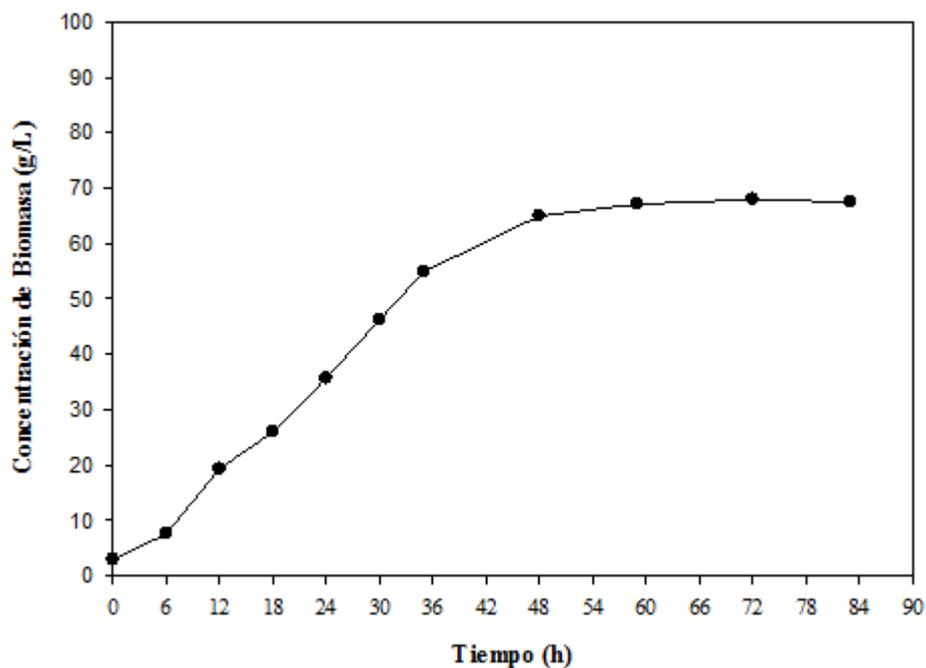


Figura 113. Curva de crecimiento de biomasa en fermentación discontinua con las condiciones de operación de pH (5), temperatura (25°C) y concentración de levadura (3g/L) aplicando el método analítico de peso seco.

2.8. Experimento 8 de la matriz experimental.

En la Tabla 44 se muestran los resultados obtenidos en el experimento 8, así como sus respectivos porcentajes de error, los cuales fueron calculados empleando la Ecuación 12.

En el experimento 8 de la matriz experimental no se eliminó ningún resultado de peso seco, ya que todos los datos de encontraron dentro del rango de aceptación 5%, es decir todos fueron considerados para realizar el promedio de muestra seca (g/mL) y así realizar posteriores análisis.

En la Tabla 45 se muestran los resultados de los promedios de pesos de muestras secas (g/L), los pesos de biomasa (g/L) y los grados Brix para cada tiempo de muestreo obtenidos en el experimento 8; y en la Figura 41 se representa – Tiempo [h] vs. Concentración de Biomasa [g/L] – con los datos expuestos en la misma tabla, donde se puede evidenciar que todos los promedios siguieron una buena tendencia con respecto al

crecimiento de levadura *S. cerevisiae*. Este ensayo finalizó a las 70 horas, no se observó la fase de adaptación debido al tiempo de muestreo y si lo hubo fue corto; el crecimiento de biomasa se dio exponencialmente aproximadamente a partir de la hora 0, alcanzando el estado estacionario a la hora 48 con una concentración promedio de biomasa de 78,1378 g/L y 6,0 grados Brix.

Tabla 129

Resultados obtenidos a partir del método analítico peso seco con sus respectivos porcentajes de error. Experimento 8 de la matriz experimental

Tiempo [h]	Peso muestra seca [g/mL]			Porcentaje de error experimental [%]		
	A ⁺	B ⁺⁺	C ⁺⁺⁺	A ⁺	B ⁺⁺	C ⁺⁺⁺
0*	0,1194	0,1243	0,1122	0,65	4,75	5,41
0	0,1197	0,1156	0,1183	1,56	1,92	0,37
6	0,1042	0,1037	0,1017	0,96	0,46	1,43
12	0,0878	0,0878	0,0877	0,05	0,05	0,10
18	0,0700	0,0716	0,0734	2,34	0,08	2,42
24	0,0532	0,0567	0,0553	3,43	2,98	0,44
30	0,0445	0,0452	0,0438	0,07	1,58	1,51
48	0,0395	0,0409	0,0401	1,65	1,87	0,21
54	0,0400	0,0400	0,0407	0,56	0,56	1,12
70	0,0409	0,0410	0,0411	0,32	0,11	0,21

Condiciones de operación: pH (5), temperatura (35°C) y concentración de levadura (3g/L).

*Los valores de la primera fila corresponden al Blanco (sin levadura *S. cerevisiae*). ⁺Primera muestra. ⁺⁺Segunda muestra. ⁺⁺⁺Tercera muestra.

Tabla 132

Concentración de biomasa a partir del método analítico peso seco. Experimento 8 de la matriz experimental

Tiempo [h]	Promedio peso muestra seca [g/mL]	Promedio peso muestra seca [g/L]	Peso biomasa [g/L]	°Brix
0*	0,1186	118,6200	0,0000	17,0
0	0,1179	117,8667	0,7667	17,0
6	0,1032	103,2200	15,4000	14,0
12	0,0878	87,7733	30,8467	12,5
18	0,0717	71,6800	46,9400	10,5
24	0,0551	55,0933	63,5267	8,5
30	0,0445	44,4933	74,1267	6,5
48	0,0402	40,1867	78,4333	6,0
54	0,0403	40,2667	78,3533	6,0
70	0,0410	40,9933	77,6267	6,0

Condiciones de operación: pH (5), temperatura (35°C) y concentración de levadura (3g/L).

*Los valores de la primera fila corresponden al Blanco (sin levadura *S. cerevisiae*).

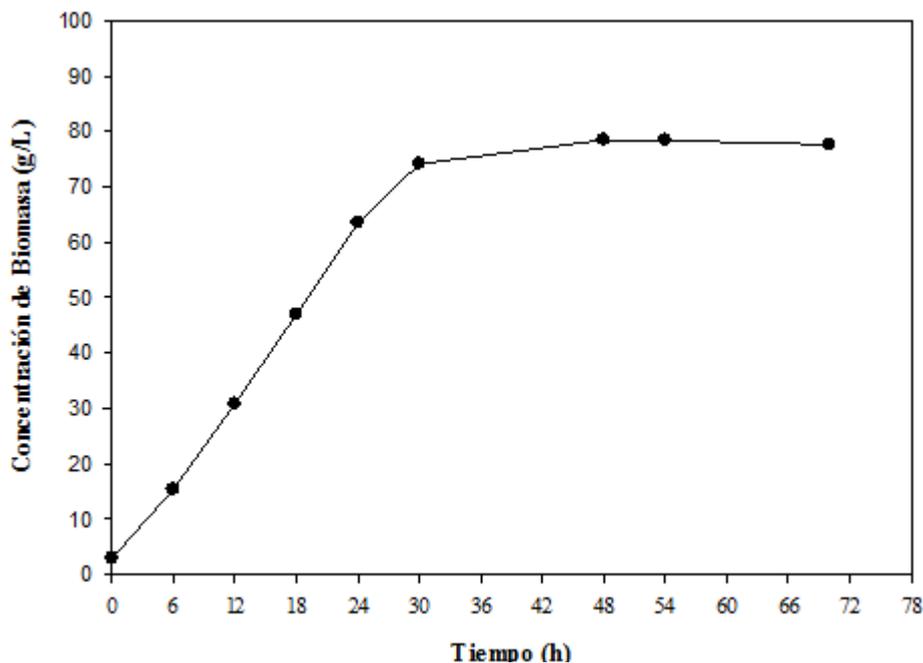


Figura 116. Curva de crecimiento de biomasa en fermentación discontinua con las condiciones de operación de pH (5), temperatura (35°C) y concentración de levadura (3g/L) aplicando el método analítico de peso seco.

2.9. Experimento 9 de la matriz experimental.

En la Tabla 46 se muestran los resultados obtenidos en el experimento 9, así como sus respectivos porcentajes de error, los cuales fueron calculados empleando la Ecuación 12.

Tabla 135

Resultados obtenidos a partir del método analítico peso seco con sus respectivos porcentajes de error. Experimento 9 de la matriz experimental

Tiempo [h]	Peso muestra seca [g/mL]			Porcentaje de error experimental [%]		
	A ⁺	B ⁺⁺	C ⁺⁺⁺	A ⁺	B ⁺⁺	C ⁺⁺⁺
0*	0,1244	0,1262	0,1259	0,90	0,55	0,35
0	0,1231	0,1226	0,1291	1,47	1,87	3,34
6	0,1175	0,1189	0,1121	1,16	2,37	3,53
12	0,1060	0,1075	0,1045	0,01	1,37	1,38
18	0,0948	0,0952	0,0984	1,38	0,99	2,37
24	0,0810	0,0849	0,0852	3,23	1,44	1,78
30	0,0760	0,0765	0,0759	0,16	0,43	0,27
35	0,0632	0,0623	0,0632	0,47	0,92	0,44
48	0,0490	0,0501	0,0525	3,00	0,91	3,91
59	0,0459	0,0489	0,0485	3,92	2,35	1,56
72	0,0481	0,0486	0,0489	0,87	0,10	0,76
83	0,0477	0,0479	0,0486	0,74	0,29	1,03

Condiciones de operación: pH (4,5), temperatura (30°C) y concentración de levadura (2g/L).

*Los valores de la primera fila corresponden al Blanco (sin levadura *S. cerevisiae*). ⁺Primera muestra. ⁺⁺Segunda muestra. ⁺⁺⁺Tercera muestra.

En el experimento 9 de la matriz experimental no se eliminó ningún resultado de peso seco, ya que todos los datos de encontraron dentro del rango de aceptación 5%, es decir todos fueron considerados para realizar el promedio de muestra seca (g/mL) y así realizar posteriores análisis.

En la Tabla 47 se muestran los resultados de los promedios de pesos de muestras secas (g/L), los pesos de biomasa (g/L) y los grados Brix para cada tiempo de muestreo obtenidos en el experimento 8; y en la Figura 42 se representa – Tiempo [h] vs. Concentración de Biomasa [g/L] – con los datos expuestos en la misma tabla, donde se puede evidenciar que todos los promedios siguieron una buena tendencia con respecto al

crecimiento de levadura *S. cerevisiae*. Este ensayo finalizó a las 83 horas, no se observó la fase de adaptación debido al tiempo de muestreo y si lo hubo fue corto; el crecimiento de biomasa se dio exponencialmente aproximadamente a partir de la hora 6, alcanzando el estado estacionario a la hora 59 con una concentración promedio de biomasa de 77,3667 g/L y 6,5 grados Brix.

Tabla 138

Concentración de biomasa a partir del método analítico peso seco. Experimento 9 de la matriz experimental

Tiempo [h]	Promedio peso muestra seca [g/mL]	Promedio peso muestra seca [g/L]	Peso biomasa [g/L]	°Brix
0*	0,1255	125,5000	0,0000	17,0
0	0,1249	124,9333	0,5667	17,0
6	0,1162	116,1667	9,3333	15,0
12	0,1060	106,0067	19,4933	14,0
18	0,0962	96,1533	29,3467	12,5
24	0,0837	83,7067	41,7933	11,5
30	0,0761	76,1267	49,3733	10,5
35	0,0629	62,9000	62,6000	9,5
48	0,0505	50,5200	74,9800	7,5
59	0,0478	47,7733	77,7267	6,5
72	0,0485	48,5467	76,9533	6,5
83	0,0481	48,0800	77,4200	6,5

Condiciones de operación: pH (4,5), temperatura (30°C) y concentración de levadura (2g/L).

*Los valores de la primera fila corresponden al Blanco (sin levadura *S. cerevisiae*).

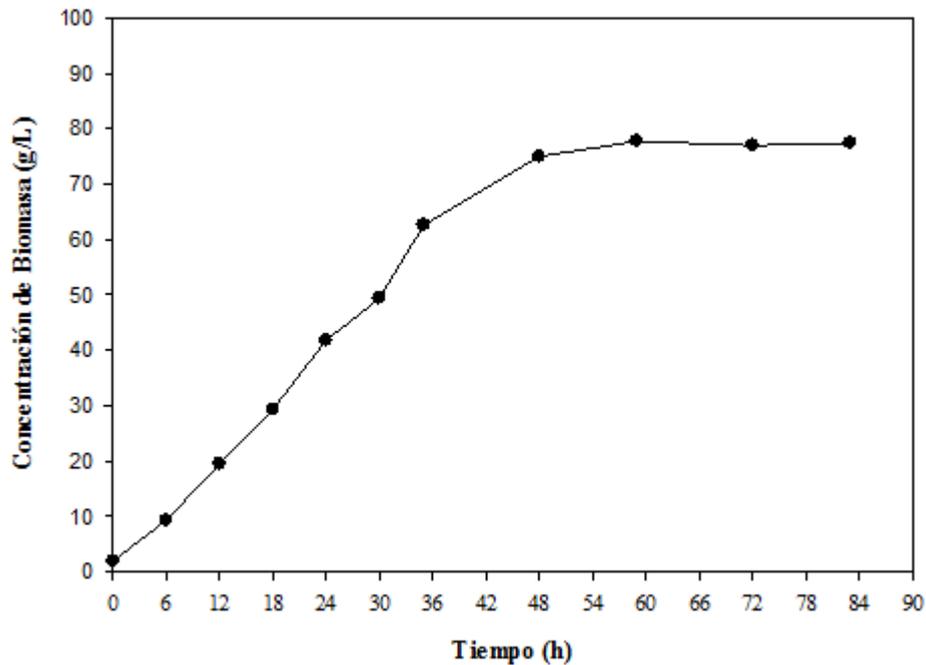


Figura 119. Curva de crecimiento de biomasa en fermentación discontinua con las condiciones de operación de pH (4,5), temperatura (30°C) y concentración de levadura (2g/L) aplicando el método analítico de peso seco.

2.9.1. Experimento 9 de la matriz experimental: Réplica.

En la Tabla 48 se muestran los resultados obtenidos en la réplica del experimento 9, así como sus respectivos porcentajes de error, los cuales fueron calculados empleando la Ecuación 12.

En la réplica del experimento 9 de la matriz experimental se eliminó el resultado del peso seco de la muestra B (0,1316 g/mL a la hora 6,0), con un error de 7,59%. Este resultado no se consideró para realizar el promedio respectivo ya que superó el porcentaje de aceptación 5,5%. Las causas por las cuales este resultado de peso seco presentó dicho porcentaje de error pudieron deberse a errores humanos. Todos los demás datos de pesos secos si fueron considerados para realizar el promedio (g/mL) y así realizar posteriores análisis.

Tabla 141

Resultados obtenidos a partir del método analítico peso seco con sus respectivos porcentajes de error. Experimento 9 de la matriz experimental: Réplica

Tiempo [h]	Peso muestra seca [g/mL]			Porcentaje de error experimental [%]		
	A ⁺	B ⁺⁺	C ⁺⁺⁺	A ⁺	B ⁺⁺	C ⁺⁺⁺
0*	0,1297	0,1295	0,1310	0,32	0,43	0,74
0	0,1289	0,1301	0,1294	0,44	0,49	0,05
6	0,1159	0,1316	0,1194	5,26	7,59	2,33
12	0,1110	0,1122	0,1123	0,75	0,35	0,40
18	0,1017	0,1038	0,1001	0,16	1,90	1,73
24	0,0904	0,0892	0,0916	0,01	1,34	1,33
30	0,0747	0,0760	0,0763	1,30	0,49	0,81
34	0,0704	0,0693	0,0721	0,28	1,78	2,07
46	0,0638	0,0639	0,0642	0,31	0,13	0,44
58	0,0620	0,0618	0,0614	0,40	0,14	0,54
70	0,0623	0,0617	0,0625	0,15	0,75	0,60
82	0,0612	0,0611	0,0614	0,08	0,21	0,28

Condiciones de operación: pH (4,5), temperatura (30°C) y concentración de levadura (2g/L).

*Los valores de la primera fila corresponden al Blanco (sin levadura *S. cerevisiae*). ⁺Primera muestra. ⁺⁺Segunda muestra. ⁺⁺⁺Tercera muestra.

En la Tabla 49 se muestran los resultados de los promedios de pesos de muestras secas (g/L), los pesos de biomasa (g/L) y los grados Brix para cada tiempo de muestreo obtenidos en la réplica del experimento 9; y en la Figura 43 se representa – Tiempo [h] vs. Concentración de Biomasa [g/L] – con los datos expuestos en la misma tabla, donde se puede evidenciar que todos los promedios siguieron una buena tendencia con respecto al crecimiento de levadura *S. cerevisiae*. Este ensayo finalizó a las 82 horas, no se observó la fase de adaptación debido al tiempo de muestreo y si lo hubo fue corto; el crecimiento de biomasa se dio exponencialmente a partir de la hora 6, alcanzando el estado estacionario a la hora 58 con una concentración promedio de biomasa de 68,3578 g/L y 7,5 grados Brix.

Tabla 144

Concentración de biomasa a partir del método analítico peso seco.
Experimento 9 de la matriz experimental: Réplica

Tiempo [h]	Promedio peso muestra seca [g/mL]	Promedio peso muestra seca [g/L]	Peso biomasa [g/L]	°Brix
0*	0,1301	130,0733	0,0000	17,0
0	0,1295	129,4667	0,6000	17,0
6	0,1223	122,2933	7,7800	15,0
12	0,1118	111,8133	18,2600	14,0
18	0,1019	101,9067	28,1667	13,0
24	0,0904	90,4133	39,6600	11,5
30	0,0756	75,6467	54,4267	10,5
34	0,0706	70,6000	59,4733	9,5
46	0,0640	63,9600	66,1133	8,5
58	0,0618	61,7533	68,3200	7,5
70	0,0622	62,1667	67,9067	7,5
82	0,0612	61,2267	68,8467	7,5

Condiciones de operación: pH (4,5), temperatura (30°C) y concentración de levadura (2g/L).

*Los valores de la primera fila corresponden al Blanco (sin levadura *S. cerevisiae*).

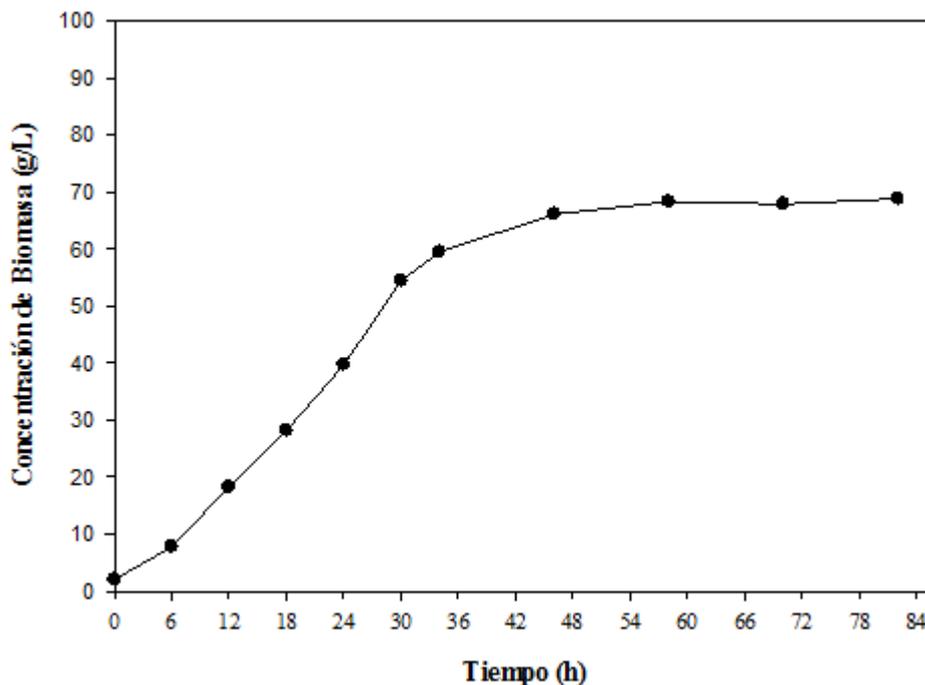
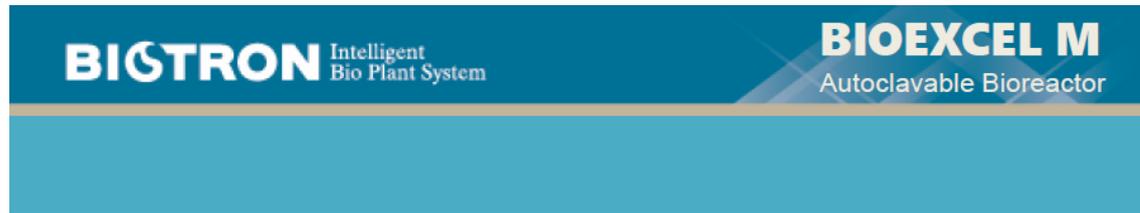


Figura 122. Curva de crecimiento de biomasa en fermentación discontinua con las condiciones de operación de pH (4,5), temperatura (30°C) y concentración de levadura (2g/L) aplicando el método analítico de peso seco. Réplica.



Anexo 3. Manual del Biorreactor Biotron GX



OPERATING MANUAL

Document	Product	Model	Ver.	Date	Item	Language
----------	---------	-------	------	------	------	----------

BIOTRON Intelligent
Bio Plant System

BIOEXCEL M
Autoclavable Bioreactor

A. INTRODUCTION

1. Introduction

This manual contains a description of the equipments, installation, operation and maintenance instruction for the Biotron GX system manufactured by the BIOTRON, INC



2. DESCRIPTION OF EQUIPMENT

The new developed bioreactor is well designed to provide a stable, reliable bio environment for various cell culture applications. This system can be employed for batch culture fed-batch culture or continuous culture with microprocessor control and PC control of pH, DO, agitation, temperature, antifoam, pump feed, vessel level accurately.

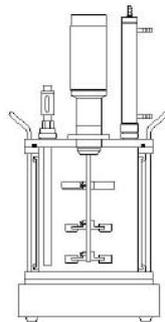
Document	Product	Model	Ver.	Date	Item	Language
----------	---------	-------	------	------	------	----------

B. DESCRIPTION OF PARTS

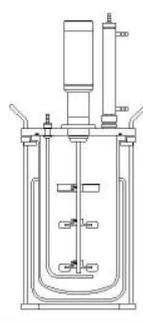
1. DESCRIPTION OF VESSEL

The vessels are normally decided according to the working volumes of real media and provide interchangeable vessel and easy to scale up with various different sizes of vessels from 2.5L, 5L, 7L and 10L. The glass vessel connected with stainless steel head plate is assembled by simple clamp. It is a convenient device to assemble into the vessel or to disassemble from one.

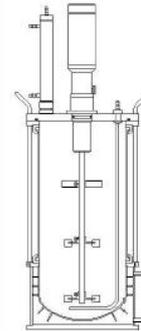
There are optional choices between the single wall vessel and double (jacket) vessel.



Single vessel



Double vessel



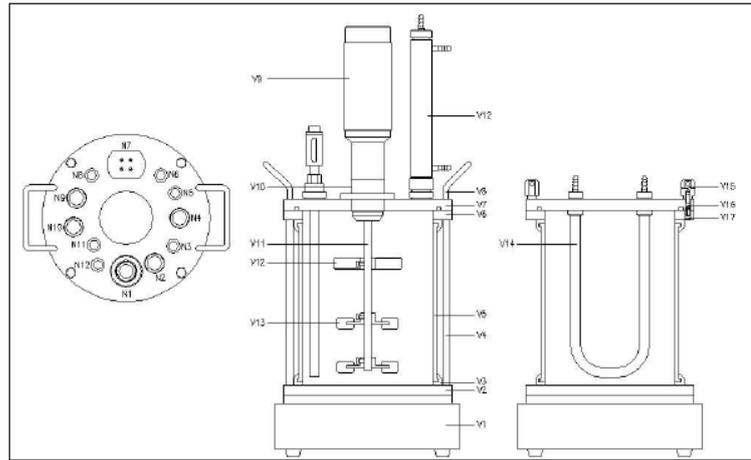
Bowl vessel



The stainless steel head plate is composed of 10 location free ports. Ports are provided in the head plate for the fixed temperature sensor, Sparger, sampling, pH electrodes, DO electrodes, a foam probe, exhaust condenser. 4 different tubes of peristaltic pump would be connected to only one line, which could be space saving in the head plate.

B. DESCRIPTION OF PARTS

2. Vessel parts and structure



N1	Inoculum Port	V1	Heater Plate
N2	Sampling Port	V2	Bottom Plate
N3	Sparger Port	V3	Packing
N4	DO Sensor Port	V4	Support
N5	Thermowell Port	V5	Glass Vessel
N6	ColdFinger Port-1	V6	Middle Plate
N7	4P Feeding	V7	Top Plate
N8	ColdFinger Port-2	V8	Handle
N9	Condenser	V9	DC Motor
N10	PH Sensor Port	V10	Bearing Housing
N11	Transfer Line	V11	Shaft
N12	Foam Sensor Port	V12	Foam Breaker
		V13	6th Turbine Impeller
		V14	U-type ColdFinger
		V15	Hexagon Nut
		V16	Top Plate Bolt
		V17	Wrench Bolt

Document	Product	Model	Ver.	Date	Item	Language
----------	---------	-------	------	------	------	----------

B. DESCRIPTION OF PARTS

3. AGITATION SYSTEM

A removable agitation DC motor located on the top of bearing housing is connected to the agitation shaft. DC motor should be removed before the sterilization and then placed in the bearing housing after the sterilization. The motor will provide agitation speed range of 50 to 1200 rpm.

In case of the motor mode, it is controlled by the speed that users set and in case of the DO model, it is controlled by the measured DO value through the DO sensor to keep the DO value that users set.

4. DO CONTROL

DO value is controlled in the range of 0 - 100%. DO value is sensed by D.O electrode and also is controlled and kept by the agitation speed. In case DO value can not be maintained by the agitation speed, DO should be increased by the pure oxygen supplies by the use of high-pressure oxygen or oxygen cylinder.

5. pH CONTROL

pH is controlled in the range of 2.00-12.00. The pH is measured by a glass electrode. Control is maintained by Acid and Base peristaltic pump by PID

6. TEMPERATURE CONTROL

Temperature automatically controls itself in the range of 8-80. This Fermentor is able to control the temperature by the use of circular water-bath and by the heat plate and cooling water of the bottom part in the single vessel and also in case of bigger vessel than the volume of 10L, cold finger is used for it.

As the water for controlling the temperature does not pass the body case, it prevent the aging and corrosion of the controlling plate and also in case of the single vessel, it is possible to control the temperature by the air cooling. RTD (Resistance Temperature Detector) is used for temperature measure.

7. FOAM CONTROL

Firstly, foam is removed through the foam breaking impeller and then in case of the remaining foam, it is sensed by foam/level sensor and anti-foam is injected and removes the foam by antifoam pump.

8. AERATION

Air and oxygen can be supplied to the medium through the ring sparger. The flow rate is controlled through the control valve, which is located on a flow meter. In case quantities of DO that users want to get by the agitation is not provided, DO should be increased by the pure oxygen supplies by the use of high-pressure oxygen or oxygen cylinder.

9.1. AIR SUPPLYING CONTROL

The air flowing amount is controlled in the range of 0-23L/min by the control of a flow meter and the flow meter suitable for the using vessel is installed. If it requires more air flowing amount, the flow meter should be replaced.

**BIGTRON** Intelligent
Bio Plant System**BIOEXCEL M**
Autoclavable Bioreactor

B. DESCRIPTION OF PARTS

9. EXHAUST SYSTEM

Gas moisture going out to the outside is condensed and then comes back to the vessel. As the gas goes out through the 0.2 air filter, there is no contamination without the air flowing.

10. SAMPLING SYSTEM

Sample is collected through the installed sampling line before the fermentation for the sampling of components during the fermentation. You can use a convenient one of 2 methods following below.

- Close the gas out line, open the sampling line and then do the Sampling by the pressure.
- Connect the silicon tube linked to the sampling line to the peristaltic pump and then do the Sampling by the pump working.

11. FED-BATCH SYSTEM

Add a small quantity of the substrate continuously after measuring DO by the added substrate of low concentration in the early process of fermentation as the indirect post. There are four type of Fed Batch mode in this system. User can select one of the mode to feed the medium or a special substrate to the fermenter.

Document	Product	Model	Ver.	Date	Item	Language
----------	---------	-------	------	------	------	----------

Anexo 4. Fotografías de la fase experimental del estudio

4.1. Recolección de las mazorcas de cacao CCN – 51.



Figura 44. Fotografía del árbol de cacao CCN – 51. Tomada en el Sector La Troncal.



Figura 125. Fotografía de la recolección de las mazorcas de cacao CCN – 51. Tomada en el Sector La Troncal.

4.2. Extracción del mucílago de cacao CCN – 51.



Figura 1286. Fotografía de las mazorcas de cacao CCN – 51. Tomada en el Laboratorio de Tecnología de Conservas Vegetales.



Figura 1317. Fotografía del mucílago de cacao CCN – 51. Tomada en el Laboratorio de Tecnología de Conservas Vegetales.



Figura 134. Fotografía del ablandamiento del mucílago de cacao CCN – 51. Tomada en el Laboratorio de Tecnología de Conservas Vegetales.



Figura 137. Fotografía de la fluidización del mucílago de cacao CCN – 51. Tomada en el Laboratorio de Tecnología de Conservas Vegetales.



Figura 140. Fotografía de la pasteurización del mucílago de cacao CCN – 51. Tomada en el Laboratorio de Tecnología de Conservas Vegetales.



Figura 143. Fotografía de la esterilización de los recipientes. Tomada en el Laboratorio de Tecnología de Conservas Vegetales.



Figura 146. Fotografía del evacuado del mucílago de cacao CCN – 51. Tomada en el Laboratorio de Tecnología de Conservas Vegetales.



Figura 149. Fotografía del almacenado (-18°C) del mucílago de cacao CCN – 51. Tomada en el Laboratorio de Tecnología de Conservas Vegetales.

4.3. Fermentación.



Figura 152. Fotografía del armado del Biorreactor. Tomada en el Laboratorio de Energía e Ingeniería de la Reacción.



Figura 155. Fotografía de la medición del mucílago de cacao CCN – 51. Tomada en el Laboratorio de Energía e Ingeniería de la Reacción.



Figura 158. Fotografía del llenado del Biorreactor con mucílago de cacao CCN – 51. Tomada en el Laboratorio de Energía e Ingeniería de la Reacción.



Figura 161. Fotografía del establecimiento de las condiciones de operación en el Biorreactor. Tomada en el Laboratorio de Energía e Ingeniería de la Reacción.



Figura 164. Fotografía de la Levadura Levapan. Tomada en el Laboratorio de Energía e Ingeniería de la Reacción.



Figura 167. Fotografía del pesaje de la levadura *S. cerevisiae*. Tomada en el Laboratorio de Energía e Ingeniería de la Reacción.



Figura 170. Fotografía de la fermentación del mucílago de cacao CCN – 51. Tomada en el Laboratorio de Energía e Ingeniería de la Reacción.

4.4. Método analítico peso seco.



Figura 173. Fotografía del pesaje del tubo vacío. Tomada en el Laboratorio de Energía e Ingeniería de la Reacción.



Figura 176. Fotografía de la toma de muestra. Tomada en el Laboratorio de Energía e Ingeniería de la Reacción.



Figura 179. Fotografía del pesaje del tubo más muestra. Tomada en el Laboratorio de Energía e Ingeniería de la Reacción.

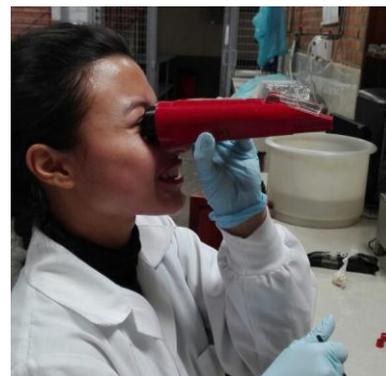


Figura 182. Fotografía de la revisión de los °Brix del mucílago de cacao CCN – 51 fermentado. Tomada en el Laboratorio de Energía e Ingeniería de la Reacción.



Figura 185. Fotografía del secado de muestra. Tomada en el Laboratorio de Energía e Ingeniería de la Reacción.



Figura 188. Fotografía del pesaje del tubo más muestra seca. Tomada en el Laboratorio de Energía e Ingeniería de la Reacción.