

Determinación de las Condiciones para la Producción Vía Fermentativa de *Saccharomyces Cerevisiae* Usando como Fuente de Carbono Lixiviados del Proceso de Fermentación del Cacao

Daniela Ríos Giraldo, Samy Saravia Santamaría
Trabajo de grado para optar por el título de Ingeniero Químico

Director:

Luis Javier López Giraldo
Ingeniero Químico, Ph.D en Ciencia de Alimentos

Co-director:

Claudia Johanna Sandoval Lozano
Bióloga, M.Sc. en Microbiología

Universidad Industrial de Santander
Facultad de Ingenierías Fisicoquímicas
Escuela de Ingeniería Química
Bucaramanga
2018

DEDICATORIA

A Dios, por ser mi guía en cada paso que doy, por brindarme sabiduría y fortaleza para culminar con éxito ésta etapa de mi vida y por su infinito amor expresado en cada instante de mi vida.

A mis padres Darío Ríos y Martha Liliana Giraldo y a mi hermana Melissa Ríos, por ser los pilares fundamentales de mi vida, por su apoyo y amor incondicionales, por su esfuerzo y dedicación, por creer en mí siempre, por estar en cada momento de mi vida y ser mi soporte, mi paño de lágrimas y mi fuerza para pararme de cada caída y seguir adelante.

A mi abuela Claribel, por ser mi amiga, mi confidente y por enseñarme que de la mano de Dios todo es posible. A ella infinitas gracias por sus constantes oraciones, preocupación y la inmensidad de su amor.

A mi compañero de tesis y de vida Samy Saravia, por su paciencia, comprensión y amor en el desarrollo de éste proyecto. Gracias amor por ser mi polo a tierra y por tener calma y transmitírmela en los momentos difíciles. ¡Somos un gran equipo!

A mis amigos, especialmente a mis colegas Camila Arce y Silvana Zamora por estar presentes en cada etapa de mi carrera y por brindarme su maravillosa amistad.

Daniela Ríos Giraldo

Principalmente a Dios, por regalarme la vida y guiarme siempre por el mejor camino.

A mi familia, especialmente a mis padres Deyzi Santamaría y Eladio Saravia por los valores que me inculcaron, por su paciencia y su apoyo incondicional durante mi carrera universitaria, en los momentos buenos y no tan buenos.

A mi hermana Saby por sus consejos y apoyo moral, a mi hermanito Alejo por llenar mi vida de felicidad.

A mi compañera de vida y de tesis Daniela Ríos por ayudarme a creer en mí mismo y ayudarme a conocer mis virtudes y debilidades, para lograr ser una mejor persona y profesional, a su familia, especialmente la Sra Claribel Franco por sus oraciones y constante apoyo espiritual.

A mis amigos, los cuales aportaron su granito de arena durante cada etapa de mi carrera profesional para poder lograr esta importante meta en mi vida y a las personas que creyeron en mí.

Samy Saravia Santamaría.

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Industrial de Santander y a la Escuela de Ingeniería Química, por su formación académica y por la exigencia y entrega de todos sus docentes, los cuales nos permitieron culminar ésta etapa de nuestras vidas de manera exitosa, siendo profesionales íntegros.

Al profesor Luis Javier López, por depositar su confianza en nosotros para llevar a cabo éste gran proyecto, por brindarnos su constante colaboración y por apoyarnos durante todo el proceso realizado bajo su dirección.

A Claudia Sandoval, por su colaboración en cada paso del proyecto y por su interés en la formación para la vida profesional.

A Jose Blanco, por transmitirnos sus conocimientos de Microbiología con amor y paciencia, por ser nuestro guía y amigo en cada etapa del proyecto.

Al Grupo de Investigación en Ciencia y Tecnología de Alimentos CICTA, por el aporte, amabilidad y compañerismo de todos sus profesionales en la realización experimental del proyecto. Un agradecimiento especial a Sergio Pico, por estar siempre dispuesto a darnos su apoyo académico, profesional y moral.

Al proyecto Desarrollo de nuevos procesos y productos para la valorización de mucílago y granos de cacao en el Departamento de Santander por su aporte financiero durante el desarrollo de nuestro proyecto.

TABLA DE CONTENIDO

	Pág.
INTRODUCCIÓN	15
1 OBJETIVOS	19
1.1 Objetivo general.....	19
1.2 Objetivos específicos	19
2 METODOLOGÍA.....	20
2.1 Primera etapa: Caracterización físico-química de los lixiviados de mucílago de cacao.....	20
2.1.1 Lixiviados del mucílago de cacao CCN51.....	20
2.1.2 Cuantificación de azúcares fermentables	21
2.1.3 Análisis bromatológico	21
2.1.4 Análisis estadístico de los lixiviados de cacao.....	21
2.2 Segunda etapa: Evaluación del crecimiento de <i>saccharomyces cerevisiae</i> en los lixiviados de mucílago de cacao sin la adición y con la adición de una fuente de nitrógeno externa.....	22
2.2.1 Microorganismo de estudio.....	22
2.2.2 Fermentaciones para la evaluación del crecimiento de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	23
2.2.3 Evaluación del crecimiento empleando el medio convencional (Sabouraud).....	23
2.2.4 Evaluación del crecimiento empleando lixiviados de mucílago de cacao sin la adición de la fuente de nitrógeno externa.	24
2.2.5 Evaluación del crecimiento empleando lixiviados de mucílago de cacao con la adición de la fuente de nitrógeno externa.	25

2.3	Tercera etapa: Fermentaciones de <i>saccharomyces cerevisiae</i> modificando la concentración de la fuente de carbono y la velocidad de agitación.....	25
3	ANÁLISIS DE RESULTADOS.....	28
3.1	Caracterización físico-química de los lixiviados de mucílago de cacao.	28
3.2	Evaluación del crecimiento de <i>saccharomyces cerevisiae</i>	32
3.3	Efecto de las modificaciones de la fuente de carbono y velocidad de agitación sobre la productividad de biomasa.	38
3.4	Optimización de la productividad de biomasa.....	40
3.5	Seguimiento de la fermentación con las condiciones óptimas encontradas para la máxima productividad de biomasa.	44
4	CONCLUSIONES	48
5	RECOMENDACIONES	49
	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	50
	APÉNDICES	55

LISTA DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1. Recolección de los lixiviados de mucílago de <i>Theobroma cacao</i> CCN51.	20
Tabla 2. Factores y niveles a evaluar en las fermentaciones con <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .	26
Tabla 3. Promedio de las concentraciones de azúcares fermentables entre los lotes.	29
Tabla 4. Análisis bromatológico de los lixiviados de mucílago de cacao CCN51.	31
Tabla 5. Porcentaje de proteína y equivalentes en amoníaco de cada lote de lixiviados.....	34
Tabla 6. Productividad de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> a diferentes concentraciones de la fuente de carbono y velocidad de agitación.....	41
Tabla 7. Errores experimentales de productividad.	43

LISTA DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Procedimiento para la adaptación y fermentación de <i>saccharomyces cerevisiae</i> ...	22
Figura 2. Cuantificación de azúcares fermentables de los lixiviados esterilizados obtenidos de la fermentación de <i>Theobroma cacao</i> CCN-51”	28
Figura 3. Hidrólisis de la sacarosa. Adaptado de Aguilar (2014).	30
Figura 4. Consumo de glucosa, biomasa (A) y productividad (B) de <i>Saccharomyces Cerevisiae</i> en caldo Sabouraud. A 30°C y 150 rpm.	32
Figura 5. Consumo de glucosa y fructosa, biomasa (A) y productividad (B) de <i>Saccharomyces Cerevisiae</i> en los lixiviados sin la adición de peptona. A 30°C y 150 rpm.	35
Figura 6. Consumo de glucosa y fructosa, biomasa (A) y productividad (B) de <i>Saccharomyces Cerevisiae</i> en los lixiviados con peptona. A 30°C y 150 rpm.	36
Figura 7. Densidad óptica (A), producción de biomasa (B), productividad (C) y seguimiento de pH y oxígeno (D) del experimento con 60 g/l de concentración de fuente de carbono y 90 rpm de velocidad de agitación.....	39
Figura 8. Superficie de respuesta medida como productividad.	41
Figura 9. Efecto de la concentración de la fuente de carbono y velocidad de agitación sobre la productividad	43
Figura 10. Diagrama de Pareto para la productividad.	44
Figura 11. Consumo de la fuente de carbono y producción de biomasa (A), productividad (B), recuento en placa (C) y seguimiento de pH y oxígeno disuelto (D) del experimento con mayor productividad.	45

LISTA DE APENDICES

	Pág.
Apéndice A. Lixiviados de mucílago de cacao sin esterilizar y estériles.	55
Apéndice B. Preparación de la muestra y condiciones cromatográficas para la cuantificación de azúcares (HPLC).	55
Apéndice C. Fotografías del procedimiento para la adaptación y fermentación de <i>saccharomyces cerevisiae</i>	56
Apéndice D. Fotografía del método de peso seco para la estimación de la biomasa.	56
Apéndice E. Fundamento de la técnica de recuento en placa.	57
Apéndice F. Vista macroscópica de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> en medio agar Sabouraud.	57
Apéndice G. Protocolo para formulación del medio a partir de los lixiviados de cacao.	57
Apéndice H. Protocolo para el montaje del biorreactor BioFlo 110 de 1 L de capacidad.	58
Apéndice I. Fotografía del montaje del biorreactor <i>new Brunswick bioflo 110</i>	59
Apéndice J. Curva de correlación entre la densidad óptica y la biomasa.	59
Apéndice K. Procedimiento para obtener los valores de productividades.	60
Apéndice L. Análisis bromatológico de los lotes de lixiviados recolectados.	60
Apéndice M. Gráficas obtenidas del experimento 1 (concentración de la fuente de carbono: 60 g/L, velocidad de agitación: 125,36 rpm)	63
Apéndice N. Gráficas obtenidas del experimento 2 (concentración de la fuente de carbono: 60 g/L, velocidad de agitación: 90 rpm)	63
Apéndice O. Gráficas obtenidas del experimento 3 (concentración de la fuente de carbono: 17,56 g/L, velocidad de agitación: 90 rpm)	64
Apéndice P. Gráficas obtenidas del experimento 4 (concentración de la fuente de carbono: 60 g/L, velocidad de agitación: 54,65 rpm)	64
Apéndice Q. Gráficas obtenidas del experimento 5 (concentración de la fuente de carbono: 60 g/L, velocidad de agitación: 90 rpm)	65
Apéndice R. Gráficas obtenidas del experimento 6 (concentración de la fuente de carbono: 90 g/L, velocidad de agitación: 115 rpm)	65

Apéndice S. Gráficas obtenidas del experimento 7 (concentración de la fuente de carbono: 90 g/L, velocidad de agitación: 65 rpm)	66
Apéndice T. Gráficas obtenidas del experimento 8 (concentración de la fuente de carbono: 30 g/L, velocidad de agitación: 115 rpm)	66
Apéndice U. Gráficas obtenidas del experimento 10 (concentración de la fuente de carbono: 102,43 g/L, velocidad de agitación: 90 rpm)	67
Apéndice V. Gráficas obtenidas del experimento 11 (concentración de la fuente de carbono: 30 g/L, velocidad de agitación: 65 rpm)	67
Apéndice W. Errores experimentales de productividad.	68

RESUMEN

TÍTULO: DETERMINACIÓN DE LAS CONDICIONES PARA LA PRODUCCIÓN VÍA FERMENTATIVA DE *SACCHAROMYCES CEREVISIAE* USANDO COMO FUENTE DE CARBONO LIXIVIADOS DEL PROCESO DE FERMENTACIÓN DE CACAO*

AUTORES: DANIELA RÍOS GIRALDO, SAMY SARAVIA SANTAMARÍA**

PALABRAS CLAVES: *SACCHAROMYCES CEREVISIAE*, *THEOBROMA CACAO* CCN-51, LIXIVIADOS, FERMENTACIÓN, PRODUCTIVIDAD.

DESCRIPCIÓN:

Los lixiviados de mucílago de cacao han sido estudiados para la obtención de diferentes productos con valor agregado, sin embargo, hasta la fecha no se ha reportado el uso de éste subproducto como materia prima para la generación de biomasa. El propósito de ésta investigación fue encontrar las condiciones óptimas de la concentración de la fuente de carbono y la velocidad de agitación en las cuales se obtuviera la mayor productividad de *Saccharomyces cerevisiae*, usando los lixiviados de mucílago de *Theobroma cacao* CCN-51.

Se caracterizaron lixiviados sin esterilizar y estériles: contenido de azúcares fermentables por HPLC y perfil bromatológico para los lixiviados estériles. Se evaluó el crecimiento de la levadura en un medio convencional y en los lixiviados sin y con la adición de una fuente de nitrógeno externa. Mediante un diseño de experimentos $2^2 + 3$ puntos centrales + 4 puntos estrellas, se realizaron 11 fermentaciones en un biorreactor de 1 L de capacidad, empleando un volumen de reacción de 500 mL para evaluar la concentración de la fuente de carbono y agitación requerida para maximizar la producción de *Saccharomyces cerevisiae*.

El promedio de carbohidratos totales fue de 13,83%. El medio de los lixiviados con la adición de la fuente de nitrógeno tuvo una mayor productividad de biomasa (1,39 g/L*h) respecto al medio sin la adición de la fuente de nitrógeno (0,26 g/L*h). El valor máximo de productividad alcanzado por la levadura fue de 2,00 g/L*h lográndose con una concentración de fuente de carbono de 69 g/L y una velocidad de agitación de 80 rpm según la superficie de respuesta obtenida.

Se concluyó que los lixiviados de cacao tienen un gran potencial para ser empleados como materia prima, debido a que presentan un alto contenido de carbohidratos (13,83%), los cuales pueden ser empleados para la producción de *Saccharomyces cerevisiae*.

* Trabajo de grado

** Facultad de Ingenierías Físicoquímicas. Escuela de Ingeniería Química. Centro de investigación en Ciencia y Tecnología de Alimentos. Director: Luis Javier López Giraldo, Ingeniero Químico Ph.D.

ABSTRACT

TITLE: DETERMINATION OF THE CONDITIONS FOR PRODUCTION FERMENTATIVE ROUTE OF *SACCHAROMYCES CEREVISIAE* USING AS A SOURCE OF CARBON LIXED FROM THE PROCESS OF COCOA FERMENTATION*

AUTHORS: DANIELA RÍOS GIRALDO, SAMY SARAVIA SANTAMARÍA**

KEY WORDS: *SACCHAROMYCES CEREVISIAE*, *THEOBROMA CACAO CCN-51*, LEACHATE, FERMENTATION, PRODUCTIVITY.

DESCRIPTION:

Cocoa mucilage leachates have been studied to obtain different products with added value, however, to date, the use of this byproduct as a raw material for the generation of biomass has not been reported. The purpose of this research was to find the optimal conditions of concentration of the carbon source and the speed of agitation in which the highest productivity of *Saccharomyces cerevisiae* was obtained, using the leaching of mucilage from *Theobroma cacao CCN-51*.

Were characterized: leaching without sterilization and sterile: content of fermentable sugars by HPLC and bromatological profile for the sterile leachates. Subsequently, the growth of the yeast in a conventional medium and in the leachate without the addition of an external nitrogen source and with the addition of this one. By means of a design of experiments 2² + 3 central points + 4 star points, 11 fermentations were carried out in a bioreactor of 1 L capacity, using a reaction volume of 500 mL to evaluate the concentration of the carbon source and agitation required to maximize production of *Saccharomyces cerevisiae*.

The average total carbohydrate was 13,83%. The medium formulated from the leachates with the addition of the nitrogen source had a higher biomass productivity (1,39 g / L * h) relative to the medium without the addition of the nitrogen source (0,26 g / L * h). The maximum productivity value reached by the yeast was 2.00 g / L * h with a carbon source concentration of 69 g/L and an agitation speed of 80 rpm according to the response surface obtained.

It was concluded that cocoa leachates have a great potential to be used as raw material, due to the fact that they have a high content of carbohydrates (13,83%), which can be used for the production of *Saccharomyces cerevisiae*.

* Undergraduate Project

** Physical and Chemical Engineering's Faculty. School of Chemical Engineering. Food Science And Technology Research Center. Advisor: Luis Javier López Giraldo. Chemical Engineer, Ph.D.

Introducción

En la actualidad, el cacao (*Theobroma cacao L*) es uno de los cultivos más importantes con fines comerciales de varios países tropicales del mundo, y sus granos son la materia prima de la industria del chocolate. El cacao se consume principalmente en productos como el chocolate, cosméticos, alimentos recubiertos como galletas y helados o productos que contienen cacao en polvo como bebidas y tortas (Perea, *et al.*, 2013).

En Colombia, las plantaciones de cacao se concentran básicamente en cuatro zonas agroecológicas: i) Montaña Santandereana, que comprende los departamentos de Santander y Norte de Santander. ii) Valles interandinos secos que comprende los departamentos de Huila, sur del Tolima y norte del Magdalena. iii) Bosque húmedo tropical que comprende las zonas de Urabá, Tumaco, Catatumbo, Arauca, Meta y Magdalena y, iv) Zona Cafetera Marginal Baja: Gran Caldas, suroeste de Antioquia, y Norte del Tolima (Superintendencia de Industria y Comercio, 2017). El principal productor en el país es el departamento de Santander (39%). En el 2016 obtuvo una producción de 22.117 toneladas, seguido de Arauca con 6.398 toneladas y, en tercer lugar, Antioquia con 5.285 toneladas (Fedecacao, 2017).

La producción agroindustrial del cacao se divide principalmente en 4 etapas: cultivo, el cual involucra todos los aspectos relacionados con la siembra del cacao. Cosecha, es el momento en el cual se recolectan los frutos del árbol de cacao. Beneficio, es aquella etapa en donde se procede a extraer las almendras o granos de la mazorca, para luego separarlos y llevarlos a un proceso de fermentación. Finalmente, la etapa de transformación, la cual incluye los procesos de limpieza, tostado, descascarillado, trituration, molienda y prensado (López, 2015). El proceso de

fermentación del cacao es el paso fundamental en el beneficio del cacao puesto que en éste proceso se desarrolla el sabor y el aroma del producto. Es un proceso complejo que consiste en una serie de cambios de carácter bioquímico y físico en todas las estructuras del grano (Fedecacao, 2014).

Los granos que se extraen de la mazorca, son depositados en cajones de madera con orificios en el fondo, para la salida de los lixiviados o líquidos que se desprenden del mucílago (Fedecacao, 2014). Éstos lixiviados son un sub-producto generado del proceso de fermentación tradicional del cacao, es un líquido amarillento y pálido, y constituye aproximadamente el 10% de la fruta del cacao (Solieri y Guidice, 2009). Los lixiviados son ricos en azúcares solubles y pectina, además de tener las características físico-químicas adecuadas para producir refrescos, bebidas alcohólicas, vinagre, pectina, entre otros (Geiser, *et al.*, 2014).

El pH inicial de la pulpa de cacao es aproximadamente 3,6 debido a su alto contenido de ácido cítrico, esto favorece el crecimiento de levaduras, junto con un bajo nivel de oxígeno. Durante el proceso de fermentación, *Saccharomyces cerevisiae* es la especie de levadura más dominante debido a su habilidad para tolerar altas concentraciones de etanol. Por lo tanto, *Saccharomyces cerevisiae* es la levadura más usada frecuentemente en fermentación de la mayoría de jugos de frutas (Solieri y Guidice, 2009).

Todos los microorganismos requieren de ciertas condiciones para su crecimiento, entre las condiciones más relevantes para el crecimiento de *Saccharomyces cerevisiae* se encuentra la temperatura, el pH, y la aireación. La temperatura óptima suele encontrarse muy cerca de la temperatura máxima soportada, para el caso de *S. cerevisiae*, ésta se encuentra entre 28°C y 35°C (Buitrago, 2007). En la fermentación de levaduras, los valores de pH entre 3 y 6 generalmente

favorecen el crecimiento y la actividad fermentativa (Durango, 2007). En cuanto a la aireación, la levadura posee una alta actividad metabólica, por lo que un proceso fermentativo en fase aerobia se caracteriza por la producción de biomasa y en fase anaerobia generalmente por la producción de etanol (Fajardo y Sarmiento, 2007).

En los sistemas de fermentación las levaduras requieren como principales nutrientes una fuente de carbono o glucosa. Sin embargo, una alta concentración de éste último sustrato puede inhibir el crecimiento de la levadura y la fermentación como resultado de una elevada presión osmótica (Galvis, 2009). Éste efecto puede ocurrir a concentraciones de azúcares fermentables superiores a 20 g/L y la inhibición aumenta de manera proporcional a la concentración de azúcares fermentables. según Papagianni *et al.* (2007), o a concentraciones entre 3 y 30 g/L según Zumbado, *et al.* (2006).

Las velocidades de agitación típicamente empleadas en los procesos de fermentación para la producción de *Saccharomyces cerevisiae* están relacionadas con el volumen de trabajo empleado. Diferentes autores han trabajado con velocidades de agitación entre 100 y 600 rpm con volúmenes de trabajo entre 1 y 3 litros (Durango, 2007, Fajardo y Sarmiento, 2007, Zhang, *et al.*, 2018 y Dall, *et al.*, 2018). Las concentraciones de la fuente de carbono empleadas en diferentes estudios varían entre 25 y 180 g/L, utilizando melaza de caña de azúcar como fuente de carbono (Durango, 2007, Fajardo y Sarmiento, 2007).

Saccharomyces cerevisiae es una de las levaduras con más estudios desarrollados debido a que es un microorganismo de fácil manipulación y recuperación. En la actualidad, se han reportado diferentes estudios en donde se utiliza ésta levadura para diferentes procesos tales como la

producción de vino (Rementeria, *et al.*, 2006), etanol (Peña y Arango, 2008), biomasa (Gómez, *et al.*, 2015), diseño de culture starter empleadas en procesos de fermentación de granos de cacao (Visintin, *et al.*, 2017).

Argüello y Villagómez (2013), realizaron un estudio en el cual implementaron *Saccharomyces cerevisiae* para la producción de vinagre a partir de lixiviados de mucílago de cacao. Por otro lado, no se han encontrado estudios que reporten la producción de biomasa a partir de éstos lixiviados, sin embargo, en investigaciones anteriores, se ha reportado el uso de éste residuo para obtener productos de valor agregado tales como jalea (Vallejo, *et al.*, 2016), postres y vinagres (Alaniz, Arvizú y González, 2013), mermelada (Jiménez y Bonilla, 2012), obtención de bebidas alcohólicas (Suárez, *et al.*, 2016), alternativa como biocombustible (Márquez y Salazar, 2015), entre otros.

De acuerdo con los párrafos anteriores, no existe un precedente del uso de una fuente rica en azúcares (10 – 13%; Ortiz y Álvarez, 2015), como lo son los lixiviados del mucílago de cacao, para la producción de una biomasa de alta aplicabilidad como lo es la levadura de *S. cerevisiae*; así las cosas, el presente trabajo tiene como alcance la determinación de la concentración de la fuente carbono y la velocidad de agitación óptimas que permitan maximizar la productividad de la biomasa producida.

1 OBJETIVOS

1.1 Objetivo general

Determinar las condiciones de cultivo para la producción de *Saccharomyces cerevisiae* usando lixiviados del proceso de fermentación del cacao.

1.2 Objetivos específicos

- Determinar desde un punto de vista físico-químico el potencial de los lixiviados de mucílago de cacao para la producción de biomasa.
- Evaluar el crecimiento de *Saccharomyces cerevisiae* en un medio de cultivo convencional y en los lixiviados de mucílago de cacao.
- Determinar el efecto de las modificaciones de la concentración de la fuente de carbono y la velocidad de agitación sobre la productividad de biomasa.

2 METODOLOGÍA

2.1 **Primera etapa:** Caracterización físico-química de los lixiviados de mucílago de cacao.

2.1.1 Lixiviados del mucílago de cacao CCN51.

Los frutos de *Theobroma cacao CCN51* fueron recolectados en el municipio del Carmen de Chucurí, Santander; seguidamente fueron transportados a las instalaciones del parque tecnológico Guatiguará – UIS. Una vez allí las mazorcas fueron desengrulladas y los granos colocados en una rejilla para recolectar por filtración los lixiviados de mucílago cacao y posteriormente ser sometidos a un proceso de fermentación a escala piloto. A partir de éste proceso se recolectaron 2 litros de los lixiviados cada 20 días aproximadamente, durante 4 meses como se puede apreciar en la Tabla 1. (Apéndice A)

Tabla 1. Recolección de los lixiviados de mucílago de *Theobroma cacao CCN51*.

Lote	1	2	3	4	5
Fecha de recolección	8/05/2018	23/05/2018	6/06/2018	18/07/2018	20/08/2018

Las muestras de lixiviados sin esterilizar fueron caracterizadas desde el punto de vista del contenido de azúcares individuales. Así mismo, los lixiviados fueron esterilizados (121°C durante 15 minutos) y caracterizados desde los puntos de vista de contenido individual de azúcares fermentables y perfil bromatológico. La densidad y el pH promedio de los lixiviados fue de 1061,8 g/L y 3,57 respectivamente.

2.1.2 Cuantificación de azúcares fermentables

Se cuantificaron los azúcares fermentables (glucosa, fructosa y sacarosa) para los dos tipos de muestras: lixiviado sin esterilizar y lixiviado estéril. Las muestras se procesaron por triplicado.

Para la cuantificación de los azúcares presentes en los lixiviados de cacao se utilizó un cromatógrafo líquido de alta eficiencia (HPLC) *Thermo Dionex Ultimate 3000*, equipado con un desgasificador, un inyector automático, un detector de índice de refracción (RI por sus siglas en inglés), y una columna COREGEL 107H 7,8 x 300 mm (8 µm) dispuesta en un horno que mantiene la temperatura en un valor constante de 30°C. La fase móvil fue agua acidificada con una concentración 8 mM de H₂SO₄ en modo isocrático y el volumen de inyección fue de 20 µL. El perfil cromatográfico se desarrolló siguiendo el protocolo del Laboratorio de Alimentos (CICTA) (ver Apéndice B).

2.1.3 Análisis bromatológico

Los parámetros y métodos empleados fueron los siguientes: humedad (GOMESL.01-gravimétrico), cenizas (GOMECH.01-gravimétrico), proteína (GOMEPL.01-volumétrico-Kjeldahl), grasa (GOMEGC.01-gravimétrico Soxhlet), fibra cruda (hidrólisis ácida y básica) y carbohidratos totales (cálculos, resolución 333 del 2011- Ministerio de Protección social), expresados en g/100 g (%) los cuales se desarrollaron siguiendo el protocolo del Laboratorio de Alimentos (CICTA).

2.1.4 Análisis estadístico de los lixiviados de cacao

Se realizó una comparación de medias para los azúcares fermentables de los lixiviados de cacao empleando la prueba de Tukey y los datos fueron procesados a través del software *Minitab® 16*, versión 16.1.0, 2010 con un intervalo de confianza del 95%.

2.2 **Segunda etapa:** Evaluación del crecimiento de *Saccharomyces cerevisiae* en los lixiviados de mucílago de cacao sin la adición y con la adición de una fuente de nitrógeno externa.

2.2.1 **Microorganismo de estudio.** La cepa *Saccharomyces cerevisiae* empleada en este estudio fue previamente aislada en el laboratorio de Bioprocesos con Microorganismos del CICTA; a partir de granos de cacao procedentes de un proceso de fermentación espontáneo, el cual se realizó en el municipio de San Vicente de Chucurí, Santander. La identificación de la levadura fue realizada mediante identificación morfológica y empleando el sistema enzimático comercial *RapiD Yeast Plus System®*.

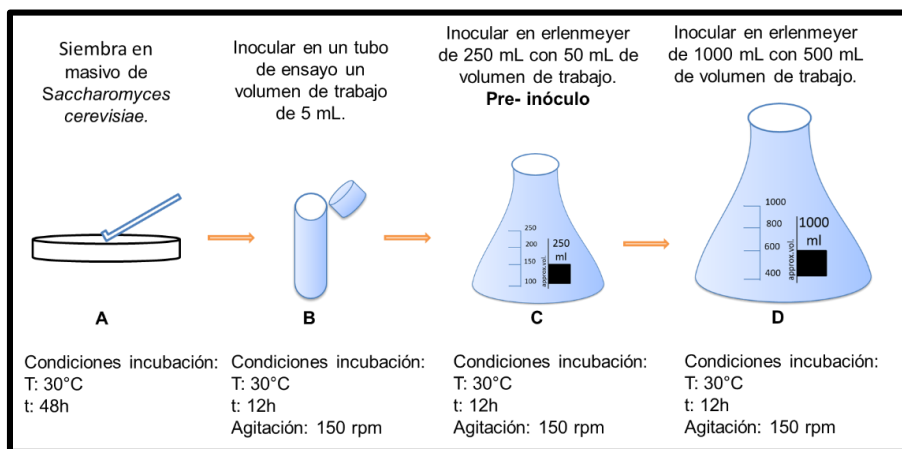


Figura 1. Procedimiento para la adaptación y fermentación de *saccharomyces cerevisiae*

La Figura 1 muestra el procedimiento realizado para la adaptación del microorganismo e inóculo final para la fermentación.

2.2.2 Fermentaciones para la evaluación del crecimiento de *Saccharomyces cerevisiae*. El seguimiento del crecimiento de la levadura se realizó con una fermentación en un erlenmeyer de 1000 mL mediante la determinación de la densidad óptica (absorbancia/unidad de longitud que recorre la luz), la concentración de biomasa (g/L) y el consumo de la fuente de carbono (g/L). La primera fermentación se realizó en un medio convencional (Sabouraud) con el fin de conocer el comportamiento de la levadura. Posteriormente, se formularon dos medios a partir de los lixiviados de cacao, el primero sin la adición de una fuente de nitrógeno externa (peptona), y el segundo con la adición de ésta.

2.2.3 Evaluación del crecimiento empleando el medio convencional (Sabouraud). En la se ilustra el proceso seguido para desarrollar el crecimiento de *Saccharomyces cerevisiae*. A continuación, se hace una breve descripción del mismo. Inicialmente, se realizó una siembra masiva de la levadura en agar Sabouraud (20 g/L glucosa, 5 g/L peptona de carne, 5 g/L peptona de caseína), la cual se incubó durante 48 horas. A partir de éste cultivo, se sembró la levadura en 5 mL de caldo Sabouraud (20 g/L glucosa, 5 g/L peptona de carne, 5 g/L peptona de caseína) y se incubó durante 12 horas. Luego se preparó un pre-inóculo en un erlenmeyer con 45 mL de caldo Sabouraud, para un volumen total de trabajo de 50 mL y se incubó durante 12 horas. Finalmente, este pre-inóculo se vertió a un erlenmeyer con 450 mL de caldo Sabouraud obteniendo un volumen final de trabajo de 500 mL. En todas las etapas las condiciones de temperatura y velocidad de agitación fueron de 30°C y 150 rpm, respectivamente (Apéndice C).

La determinación de la densidad óptica se realizó tomando alícuota de 200 μ l, los cuales se depositaron en una microplaca para su posterior análisis en un espectrofotómetro *Thermo Scientific Multiskan Go* ajustado a una longitud de onda de 600 nm (Held, 2010).

La estimación de la concentración de la biomasa se realizó mediante el método de peso seco propuesto por (De Martín, 2005). Para ello se utilizaron filtros PVDF hidrofílicos de 0,45 μ m x 0,22 mm que fueron secados una hora en una estufa *Binder ED 53* a 65°C y posteriormente depositados en un desecador durante 24 horas. Cada filtro se pesó antes de ser utilizado y en seguida se tomaron 5 mL de la muestra para ser filtrados al vacío. El filtro se colocó en la estufa a 65°C por 6 horas y se pesó para obtener la biomasa (ver Apéndice D).

La cuantificación de los azúcares fermentables se realizó por medio de la técnica de HPLC descrita en la primera etapa (2.1.2).

El recuento de *S. cerevisiae* se determinó empleando la técnica de recuento en placa para el pre-inóculo y el tiempo cero (Arnáiz, Isac, y Lebrato, 2000). Para el crecimiento se sembraron 0,1 ml de las diluciones de 10^{-5} – 10^{-7} en cajas con agar Sabouraud más 0,1% de cloranfenicol y se incubaron a 30°C durante 24 horas (ver Apéndice EApéndice D). Los resultados se expresaron en unidades formadoras de colonia por mililitro (UFC/mL). Todas las siembras se realizaron en cámara de flujo laminar (ver Apéndice F). En todas las fermentaciones realizadas, la levadura inició con una población en un orden de 10^6 UFC/mL.

2.2.4 Evaluación del crecimiento empleando lixiviados de mucílago de cacao sin la adición de la fuente de nitrógeno externa. Una vez observado el comportamiento de la levadura

en el medio convencional, se procedió a realizar la fermentación en los lixiviados de mucílago de cacao. El seguimiento del crecimiento de *Saccharomyces cerevisiae* se realizó empleando el procedimiento descrito en la figura 1 mediante la determinación de la densidad óptica, la concentración de biomasa (g/L) y el consumo de la fuente de carbono (g/L) cada dos horas durante dos días y medio, como fueron descritos en el numeral (2.2.3). En todas las etapas las condiciones de temperatura y velocidad de agitación fueron de 30°C y 150 rpm, respectivamente.

2.2.5 Evaluación del crecimiento empleando lixiviados de mucílago de cacao con la adición de la fuente de nitrógeno externa. Paralelamente a la etapa 2.2.4, se realizó una fermentación en el medio formulado con los lixiviados adicionando una fuente de nitrógeno externa (peptona) (ver Apéndice G), el objetivo en este caso fue determinar la influencia de ésta fuente sobre el crecimiento de la levadura. Al igual que con las fermentaciones anteriores, el seguimiento del crecimiento de la levadura se llevó a cabo mediante la determinación de la densidad óptica, la concentración de biomasa (g/L) y el consumo de la fuente de carbono (g/L) cada hora durante 14 horas, como fueron descritos en el numeral 2.2.3. En todas las etapas las condiciones de temperatura y velocidad de agitación fueron de 30°C y 150 rpm, respectivamente.

2.3 Tercera etapa: Fermentaciones de *Saccharomyces cerevisiae* modificando la concentración de la fuente de carbono y la velocidad de agitación.

Las fermentaciones se realizaron en un biorreactor *New Brunswick BioFlo 110* de 1 L de capacidad, empleando un volumen de reacción de 500 mL, las variables independientes que se evaluaron fueron la concentración de la fuente de carbono y la velocidad de agitación; siendo la productividad de biomasa la variable de respuesta seleccionada. Además, se realizó un

seguimiento del oxígeno disuelto y el pH. Antes de iniciar la fermentación se realizó la instalación de las conexiones del biorreactor, se incorporó el medio de cultivo formulado y se calibró el sensor de oxígeno (ver Apéndice H y Apéndice I).

Para evaluar el efecto de las variables independientes sobre la productividad de biomasa de *Saccharomyces cerevisiae*, usando los lixiviados de mucílago de cacao, se realizó un diseño de experimentos $2^2 + 3$ puntos centrados en las caras + 4 puntos estrellas (Tabla 2), de esta manera se definieron 11 experimentos. Para el diseño se empleó el software *Statgraphics Centurion XVI*, versión 16.1.03, 2010 – versión de prueba. Los niveles inferior y superior de cada uno de los factores evaluados se establecieron según la bibliografía consultada (Zhang *et al*, 2018, Ortiz, *et al.*, 2008, De Martín, 2005, Papagianni, M., Boonpooh, Y., Matthey, M., & Kristiansen, B., 2007).

Tabla 2. Factores y niveles a evaluar en las fermentaciones con *Saccharomyces cerevisiae*.

Experimento	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
Concentración											
fuerza de carbono (g/L)	60,00	60,00	17,57	60,00	60,00	90,00	90,00	30,00	60,00	102,43	30,00
Velocidad de agitación (rpm)	125,36	90,00	90,00	54,65	90,00	115,00	65,00	115,00	90,00	90,00	65,00

El seguimiento del crecimiento de *Saccharomyces cerevisiae* se llevó a cabo por medio de la $DO_{(600nm)}$, la cual fue transformada a biomasa empleando la curva de correlación con los valores de la densidad óptica y el peso seco obtenidos del medio Sabouraud, determinada en el numeral 2.2.3 (ver Apéndice J). El modelo utilizado para ajustar los datos experimentales de concentración vs tiempo, fue el modelo *Dose-Response Logistic* empleando el software *CurveExpert Basic*,

versión 2.1.0, 2017 – versión de prueba (ver Apéndice K). La superficie de respuesta del diseño fue analizada en *Statgraphics Centurion XVI*, versión 16.1.03, 2010. El experimento con la mayor productividad alcanzada se llevó a cabo nuevamente realizando la determinación de la densidad óptica, el recuento en placa y el consumo de la fuente de carbono cada hora durante 12 horas.

3 ANÁLISIS DE RESULTADOS

En el presente capítulo se muestran los resultados obtenidos de todos los análisis realizados y sus correspondientes discusiones, en relación con los objetivos planteados al inicio de éste estudio.

3.1 Caracterización físico-química de los lixiviados de mucílago de cacao.

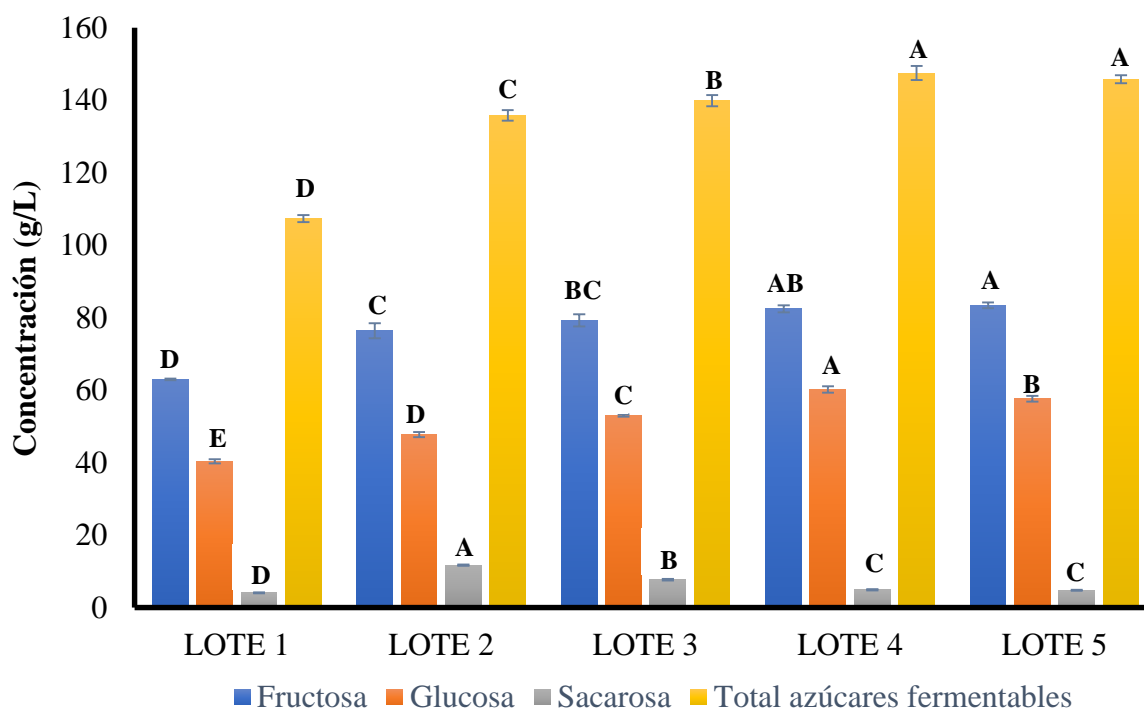


Figura 2. Cuantificación de azúcares fermentables de los lixiviados esterilizados obtenidos de la fermentación de *Theobroma cacao* CCN-51^{1,2,3}

¹ Los azúcares fermentables corresponden a la suma de la fructosa, la glucosa y la sacarosa.

² La comparación de medias se realizó entre lotes para cada uno de los azúcares fermentables. Las letras representan la agrupación entre cada azúcar y las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

³ La prueba de Tukey se desarrolló con un intervalo de confianza del 95%.

En la Figura 2 se aprecia que de acuerdo con la prueba de Tukey la fructosa no presentó diferencias significativas entre los lotes 2 - 3, 3 - 4 y 4 - 5; mientras que el lote 1 presentó diferencias significativas con relación a los demás lotes. Así mismo, la glucosa, mostró variabilidad entre todos los lotes. Para el caso de la sacarosa, no se observaron diferencias significativas entre los lotes 4 y 5 únicamente. También se puede notar que la fructosa se encontró en mayor proporción, seguida de la glucosa y por último la sacarosa. Así mismo, en la Figura 2 se aprecia que, con excepción del lote 1, el contenido de azúcares fermentables de los demás lotes se encuentra en el mismo orden de magnitud.

En la Tabla 3. se muestra el perfil de azúcares de los lixiviados de mucílago de cacao antes y después del proceso de esterilización. De acuerdo con los resultados se presentó una disminución mínima en el total de azúcares fermentables, pasando de una concentración de 138,03 g/L o lo que es equivalente en porcentaje másico a 13,00% en los lixiviados sin esterilizar, a 135,26 g/L o 12,74% de lixiviados estériles; éste resultado muestra claramente que después del proceso de esterilización sólo se termo-degradan 0,26% de los azúcares fermentables y en consecuencia se decidió trabajar con los lixiviados de cacao esterilizados minimizando así la contaminación cruzada en el proceso de fermentación.

Tabla 3. Promedio de las concentraciones de azúcares fermentables entre los lotes.

AZÚCAR	LIXIVIADO SIN ESTERILIZAR (g/L)	LIXIVIADO ESTÉRIL (g/L)
Fructosa	64,00 ± 6,89	76,89 ± 8,27
Glucosa	47,21 ± 7,50	51,75 ± 7,96
Sacarosa	26,81 ± 12,05	6,62 ± 3,16

Total azúcares fermentables	138,03 ± 21,10	135,26 ± 16,30
-----------------------------	-----------------------	-----------------------

Por otro lado, el perfil de azúcares fermentables de los lixiviados de mucílago de cacao estériles obtenidos en el presente estudio fueron de 7,24% de fructosa, 4,87% de glucosa y 0,62% de sacarosa. Éstos resultados contrastan con los reportados por Balladares (2015), quien encontró una concentración de fructosa de 4,42%, sacarosa 2,15% y glucosa 2,13% en lixiviados de cacao. Por su parte, Quimbita, *et al.* (2013), encontraron porcentajes de 3,06% para la fructosa, 2,79% para la glucosa y 6,11% de sacarosa. Finalmente, Anvoh (2009) reportó que los lixiviados de cacao contienen 21,42% de glucosa y 2,13% de sacarosa. La diferencia de porcentajes de azúcares individuales presentada en el párrafo anterior puede asociarse con: diferentes condiciones agroclimáticas (Colombia, Ecuador y Costa de Marfil) o a la diferencia en los genotipos evaluados (CCN-51 y Forastero).

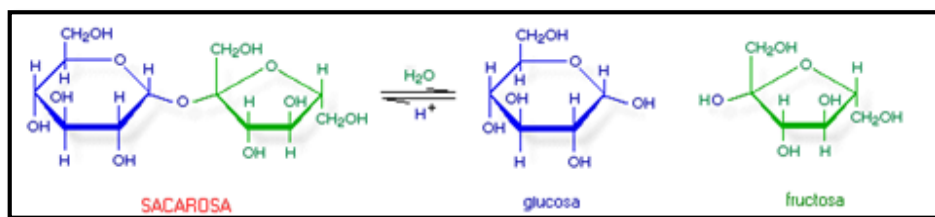


Figura 3. Hidrólisis de la sacarosa. Adaptado de Aguilar (2014).

Además, en la Tabla 3. se aprecia que el contenido de sacarosa disminuye de $26,81 \pm 12,05$ a $6,62 \pm 3,16$. De esta disminución se infiere que la sacarosa se hidroliza (Jeréz, 2008), a sus formas monoméricas glucosa y fructuosa, las cuales aumentaron de $47,21 \pm 7,50$ a $51,75 \pm 7,96$ y de $64,00 \pm 6,89$ a $76,89 \pm 8,27$, respectivamente. Nótese el proceso de hidrólisis no se desarrolló de manera

equimolar (Figura 3); esto se puede explicar desde dos puntos de vista: el primero, por la producción de reacciones de Maillard (Corzo, 2010) debido al pH ácido de los lixiviados de mucílago de cacao y a que las sustancias nitrogenadas presentes en éste (aminoácidos, polipéptidos y proteínas) podrían haber reaccionado con los azúcares reductores (glucosa y fructosa) en diferentes proporciones y el segundo, a la transposición de Bruyn-van Ekenstein en la cual una aldosa (glucosa) se puede convertir en una cetosa (fructosa) y viceversa (Miljkovic, 2009), dando como resultado la diferencia entre las concentraciones al final del proceso de esterilización (Tabla 3).

Tabla 4. Análisis bromatológico de los lixiviados de mucílago de cacao CCN51.

PARÁMETRO (%)	LOTE 1	LOTE 2	LOTE 3	LOTE 4	LOTE 5	PROMEDIO (%)
Humedad	87,21	85,49	84,66	84,48	86,09	85,59
Ceniza	0,34	0,29	0,28	0,38	0,27	0,31
Proteína	0,27	0,22	0,29	0,30	0,25	0,27
Carbohidratos totales	12,17	14,00	14,76	14,84	13,39	13,83

El análisis bromatológico realizado a cada uno de los lotes de lixiviados muestra un comportamiento semejante para cada parámetro en todos los lotes (Tabla 4, Apéndice L). En cuanto a los carbohidratos totales, se observa un promedio de 13,83%. Éstos valores son similares a los reportados por Ortiz y Álvarez (2015), quienes en su investigación aseveran que los lixiviados de mucílago de cacao poseen entre 10 a 13% de contenido de azúcares. Éste valor también es comparable con el valor reportado por Balladares (2015), el cual encuentra en su estudio que los

lixiviados de cacao contienen 12,33% de azúcares. Por otro lado, el valor de carbohidratos totales reportado en el presente estudio difiere con el de Argüello y Villagómez (2013), quienes hallan en su investigación un contenido de azúcares totales del 16,50%. Nuevamente, las diferencias pueden explicarse por las disímiles condiciones agroclimáticas y de genotipos de los lixiviados de cacao analizadas por los autores anteriormente mencionados.

3.2 Evaluación del crecimiento de *Saccharomyces cerevisiae*.

Para la evaluación del crecimiento de *Saccharomyces cerevisiae* se utilizaron dos medios de cultivos, el medio convencional (Sabouraud) y el medio formulado usando los lixiviados de mucílago de cacao estéril. La Figura 4 muestra el consumo de glucosa y la biomasa producida, así como la productividad alcanzada por la levadura en caldo Sabouraud.

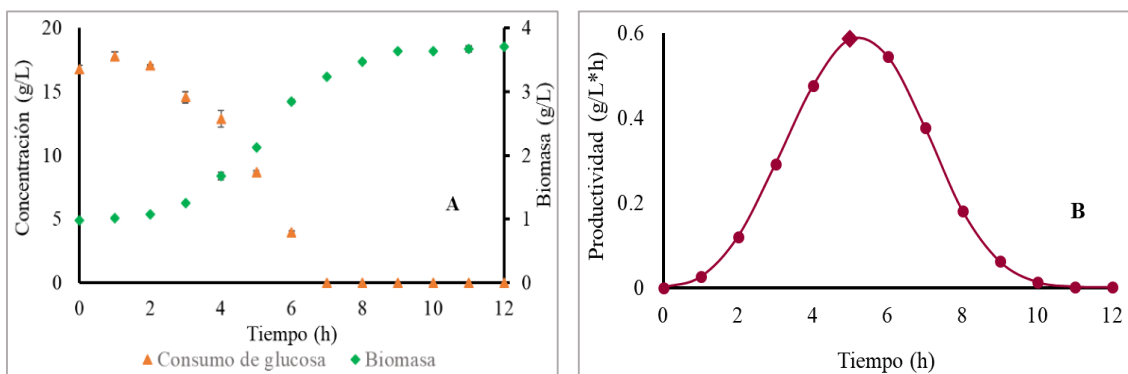


Figura 4. Consumo de glucosa, biomasa (A) y productividad (B) de *Saccharomyces Cerevisiae* en caldo Sabouraud. A 30°C y 150 rpm.

Como se observa en la figura 4.A *Sacharomyces cerevisiae* consume la fuente de carbono que en este caso es la glucosa, desde la hora 2 hasta la hora 7 y a partir de esta hora el sustrato se agota en su totalidad; confirmándose así que la glucosa es un sustrato de fácil asimilación. También se

observa que la levadura presentó una fase de adaptación o latencia de aproximadamente 2 horas, seguida de una fase exponencial de 7 horas hasta llegar a la fase estacionaria alrededor de la hora 9 con una concentración de biomasa de 3,65 g/L. En la hora 5 alcanzó su mayor productividad con un valor de 0,59 g/L*h (Figura 4.B).

Éste comportamiento era el esperado en caldo Sabouraud, y las fases de crecimiento fueron similares a las reportadas por Rubio, *et al.* (2008) y Cardozo y Moreno (2012), los cuales utilizaron el medio convencional YPG. En cuanto al máximo de concentración de biomasa (3,65 g/L), este valor está en el mismo orden de magnitud al reportado por Rubio, *et al.* (2008), quienes obtuvieron una concentración de 3,00 g/L en el medio de cultivo YPD, y difiere con el valor reportado por Buitrago y Tenjo (2007), quienes obtuvieron en su investigación una concentración de biomasa de 6,33 g/L en medio YGC; cabe mencionar que los medios mencionados tienen la misma concentración de glucosa que el medio Sabouraud pero difieren en la fuente de nitrógeno y micronutrientes.

En lo que respecta al nitrógeno, se ha demostrado que éste es uno de los nutrientes más importantes para mantener el metabolismo de las levaduras, debido a que es un elemento fundamental para la síntesis de aminoácidos, proteínas, y otros metabolitos cruciales en la fisiología de las levaduras (Cabello, 2012). La fuente de nitrógeno asimilable por *Sacharomyces cerevisiae* debe administrarse en forma de amoníaco, urea o sales de amonio, aunque también se pueden emplear mezclas de aminoácidos. Ni el nitrato ni el nitrito pueden ser asimilados por ésta levadura (Leveau y Bouix, 2006).

A partir del porcentaje de proteína contenido en cada lote de lixiviados de mucílago de cacao (Tabla 4), se determinaron los equivalentes en amoníaco para cada uno de los lotes. La Tabla 5 presenta el porcentaje de proteína contenido en cada lote de lixiviados, así como su equivalente en amoníaco.

Tabla 5. Porcentaje de proteína y equivalentes en amoníaco de cada lote de lixiviados

Lote	Proteína (%)	Equivalente en amoníaco (% másico)
1	0,27	0,0523
2	0,22	0,0426
3	0,29	0,0561
4	0,30	0,0581
5	0,25	0,0484
PROMEDIO	0,27	0,0515

Éstos resultados muestran que los lixiviados de cacao contienen una fuente de nitrógeno que puede estar disponible para su requerimiento nutricional. Con el fin de conocer ésta disponibilidad, se evaluó el crecimiento por $DO_{(600nm)}$ y posteriormente se correlaciono con la biomasa y el consumo de la fuente de carbono (Figura 5).

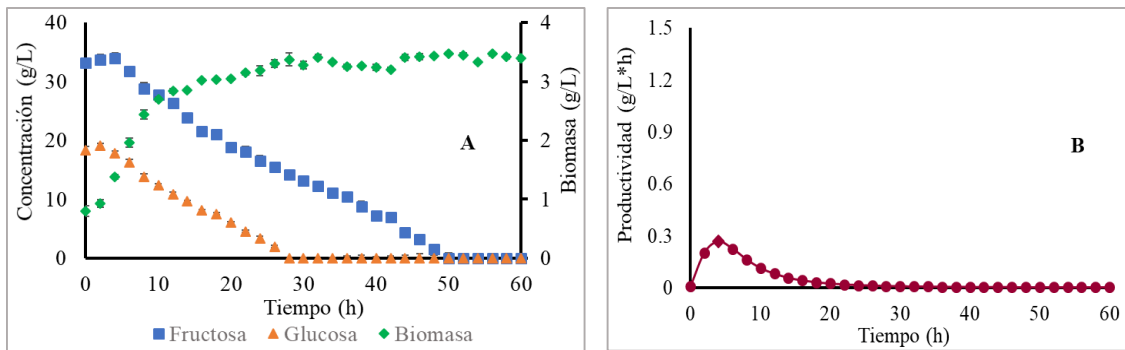


Figura 5. Consumo de glucosa y fructosa, biomasa (A) y productividad (B) de *Saccharomyces Cerevisiae* en los lixiviados sin la adición de peptona. A 30°C y 150 rpm.

La figura 5.A presenta la biomasa producida por *Saccharomyces cerevisiae* y el consumo de la fuente de carbono que en el caso de los lixiviados de mucílago de cacao corresponde a la glucosa y fructosa. El seguimiento de la fermentación se realizó cada dos horas durante 60 horas. La levadura consumió la glucosa y la fructosa de manera simultánea agotándose primero la glucosa a las 28 horas, seguida de la fructosa a las 50 horas. En cuanto a la generación de biomasa, la concentración inicial fue de 0,80 g/L y alcanzó su fase estacionaria en la hora 26 con una concentración de 3,41 g/L. Por otro lado, su productividad máxima fue de 0,26 g/L*h en la hora 4 (Figura 5.B).

Es importante mencionar que la solubilidad de los azúcares es mayor a medida que aumenta la temperatura (Browne, 1923), por ésta razón en la figura 5.A se puede apreciar que a la hora 0 la concentración de azúcares fermentables presenta un valor por debajo de la hora 1, esto se debe a que al inicio de las fermentaciones el medio de cultivo no se encontraba a la temperatura óptima de crecimiento de la levadura (30°C), ya que, con el fin de evitar su contaminación, éste se mantuvo refrigerado (aproximadamente 15°C).

Saccharomyces cerevisiae utiliza en primer lugar la fuente de carbono y energía más fácilmente asimilable, tal como la glucosa (Galvis, 2009). Como se mencionó anteriormente, los lixiviados de cacao tienen como fuente de carbono la glucosa y la fructosa, como se evidencia en la Figura 5, la levadura no tuvo una preferencia en el consumo de uno de los dos sustratos disponibles, por el contrario consumió los dos de manera simultánea. Esto puede ocurrir debido a que la levadura es una cepa nativa aislada de un proceso de fermentación espontáneo de granos de cacao, por lo cual se encuentra adaptada a éstas fuentes de carbono.

Paralelo al proceso de fermentación llevado sin fuente de nitrógeno externa, se decidió evaluar el crecimiento del microorganismo adicionando una fuente de nitrógeno (peptona) en el medio formulado a partir de los lixiviados de mucílago de cacao. Éste seguimiento se realizó por $DO_{(600nm)}$ (expresada en términos de concentración de biomasa) y el consumo de la fuente de carbono cada hora durante 14 horas (Figura 6).

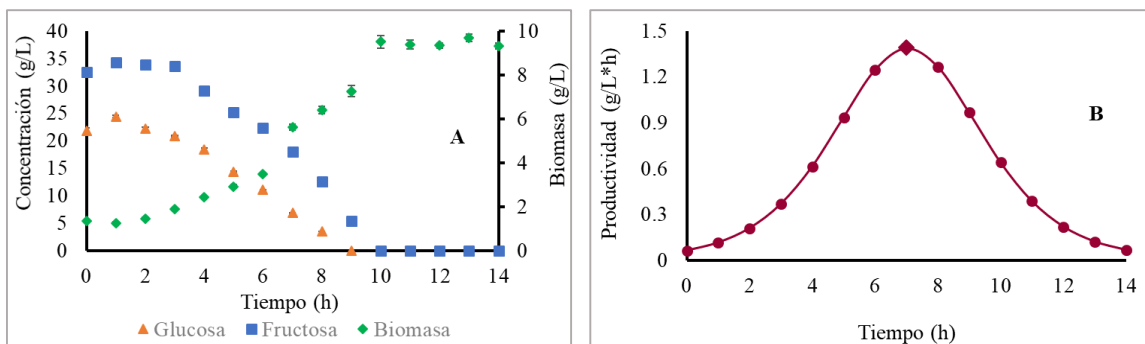


Figura 6. Consumo de glucosa y fructosa, biomasa (A) y productividad (B) de *Saccharomyces Cerevisiae* en los lixiviados con peptona. A 30°C y 150 rpm.

El consumo de glucosa y fructosa al igual que en el medio sin la adición de la fuente de nitrógeno, se llevó a cabo de manera simultánea, agotándose la glucosa a las 9 horas, seguida de la fructosa a la hora 10. La concentración inicial de biomasa fue de 1,34 g/L y alcanzó la fase estacionaria a la hora 10 con una concentración de biomasa de 9,50 g/L. El máximo valor de productividad fue de 1,39 g/L*h alcanzada en la hora 7.

Los resultados muestran que *Saccharomyces cerevisiae* alcanzó su máxima producción de biomasa (9,50 g/L) en menor tiempo (10 horas) en el medio con la adición de peptona, comparada con la del medio sin la adición de peptona que fue de 3,41 g/L en un tiempo de 26 horas. Así mismo, la levadura tomó un mayor tiempo (7 horas) en alcanzar la máxima productividad en el medio con peptona (1,39 g/L*h), sin embargo, ésta fue más alta comparada con la del medio sin peptona la cual fue de 0,26 g/L*h, alcanzada en un tiempo de 4 horas.

Éstos resultados indican que, aunque los lixiviados de cacao contienen una fuente de nitrógeno, ésta no se encuentra en la forma asimilable por *Sacharomyces cerevisiae*, por ende, no le permite sintetizar los aminoácidos, proteínas y demás metabolitos fundamentales de la mejor manera; lo que conlleva a evidenciar un mayor crecimiento y productividad de *Saccharomyces cerevisiae* en el medio formulado a partir de los lixiviados de mucílago de cacao con la adición de la fuente de nitrógeno externa (peptona). Por lo anterior, se decidió continuar las fermentaciones de *Saccharomyces cerevisiae* en el medio formulado a partir de los lixiviados con la adición de peptona.

3.3 Efecto de las modificaciones de la fuente de carbono y velocidad de agitación sobre la productividad de biomasa.

Después de determinar las condiciones de crecimiento de *Saccharomyces cerevisiae* en los lixiviados de mucílago de cacao, se llevaron a cabo once fermentaciones para determinar la concentración de la fuente de carbono y la velocidad de agitación que maximizan la productividad de biomasa. El seguimiento del crecimiento de *S. cerevisiae* se realizó con la $DO_{(600nm)}$ y a partir de ésta se obtuvieron las curvas de biomasa y productividad. Además, se realizó un seguimiento del porcentaje de oxígeno disuelto y el pH.

La Figura 7 presenta los resultados obtenidos del experimento que alcanzó la mayor productividad.

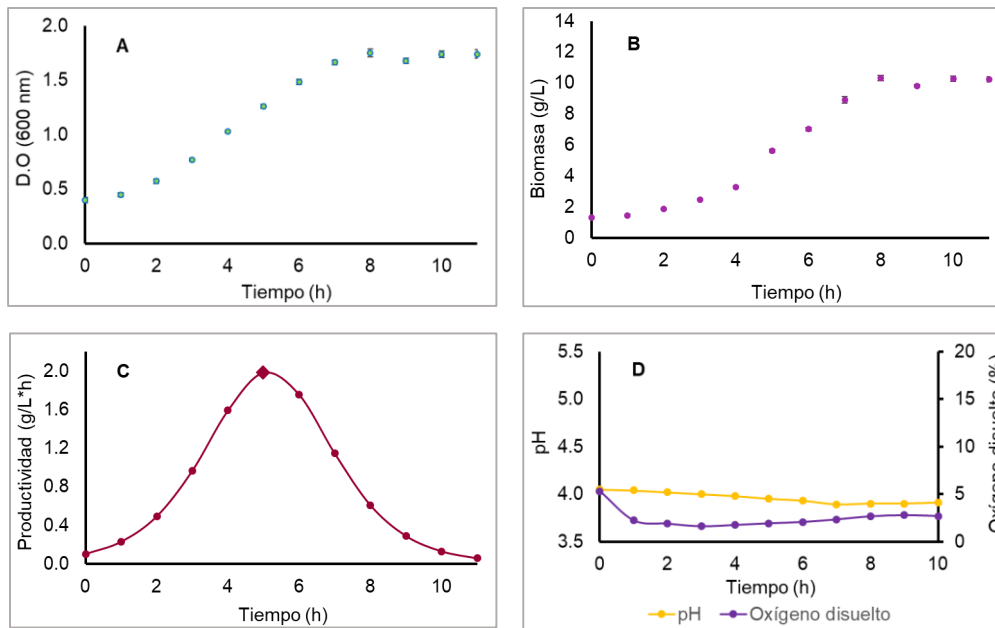


Figura 7. Densidad óptica (A), producción de biomasa (B), productividad (C) y seguimiento de pH y oxígeno (D) del experimento con 60 g/l de concentración de fuente de carbono y 90 rpm de velocidad de agitación

Como se observa en la figura 7.A, *Sacharomyces cerevisiae* presentó una fase de adaptación o latencia de una hora, seguida de una fase exponencial de 7 horas hasta llegar a la fase estacionaria alrededor de la hora 8 con un valor de densidad óptica de 1,80 y una concentración de biomasa de 10,77 g/L (Figura 7.B). En la hora 5 alcanzó su mayor productividad con un valor de 2,07 g/L*h (Figura 7.C). El pH comenzó con un valor de 4,05 y fue decreciendo hasta alcanzar un valor de 3,90. Respecto al oxígeno disuelto, éste inició con un valor de 5,30% seguido de un leve decrecimiento hasta la hora 3 con un valor de 1,63%, finalmente, con un ligero aumento del oxígeno disuelto, éste logró estabilizarse en un valor de 3,90% en la hora ocho. (Figura 7.D).

El comportamiento de las variables en los once experimentos fue similar. La fase de latencia o adaptación tuvo una duración entre una y dos horas, se evidenció un tiempo entre seis y ocho horas en la fase logarítmica (fase exponencial) y entre la hora seis y diez alcanzó la fase estacionaria. La variación del tiempo en el cual la levadura permaneció en la fase exponencial se debió principalmente a la concentración de la fuente de carbono que tenía cada fermentación. La mayor concentración de biomasa alcanzada estuvo entre 5,80 y 13,45 g/L, el máximo valor de productividad se obtuvo entre las horas 4 y 7 de fermentación y el rango estuvo entre 1,20 y 2,07 g/L*h.

El rango de pH al inicio de las fermentaciones realizadas fue de 3,77 a 5,23, ésta variación se presentó ya que, al momento de la formulación de los medios según el diseño de experimentos, el volumen de agua destilada (pH= 7) necesario para realizar la dilución, contribuyó al aumento proporcional del pH final del medio. En todos los experimentos se observa que el pH disminuye paulatinamente hasta alcanzar su estabilización, esto se debe a las reacciones metabólicas que la levadura lleva a cabo, producen sustancias ácidas que acidifican el medio (Durango, 2007). Con respecto al porcentaje de oxígeno disuelto, el comportamiento varió en todos los experimentos debido a la sensibilidad del sensor de oxígeno, sin embargo, la mayoría de ellos alcanzaron una estabilidad. Para una información más detallada, dirigirse a los Apéndices de la M a la V.

3.4 Optimización de la productividad de biomasa.

En la Tabla 6 se muestran los valores de productividad obtenidos en la producción de biomasa de *Saccharomyces cerevisiae* en diferentes concentraciones de fuente de carbono y velocidades de agitación.

Tabla 6. Productividad de *Saccharomyces cerevisiae* a diferentes concentraciones de la fuente de carbono y velocidades de agitación

Experimento	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
Concentración fuente de carbono (g/L)	60,00	60,00	17,57	60,00	60,00	90,00	90,00	30,00	60,00	102,43	30,00
Velocidad de agitación (rpm)	125,36	90,00	90,00	54,65	90,00	115,00	65,00	115,00	90,00	90,00	65,00
Productividad (g/L*h)	1,66	1,89	1,20	2,05	1,98	1,66	1,69	1,73	2,07	1,72	1,35

En la Figura 8 se puede apreciar la superficie de respuesta obtenida a partir de los experimentos desarrollados. El análisis de la interacción entre los factores demostró que entre 75 y 85 rpm y a concentraciones de la fuente de carbono entre 65 y 75 g/L se obtienen las mayores productividades de biomasa.

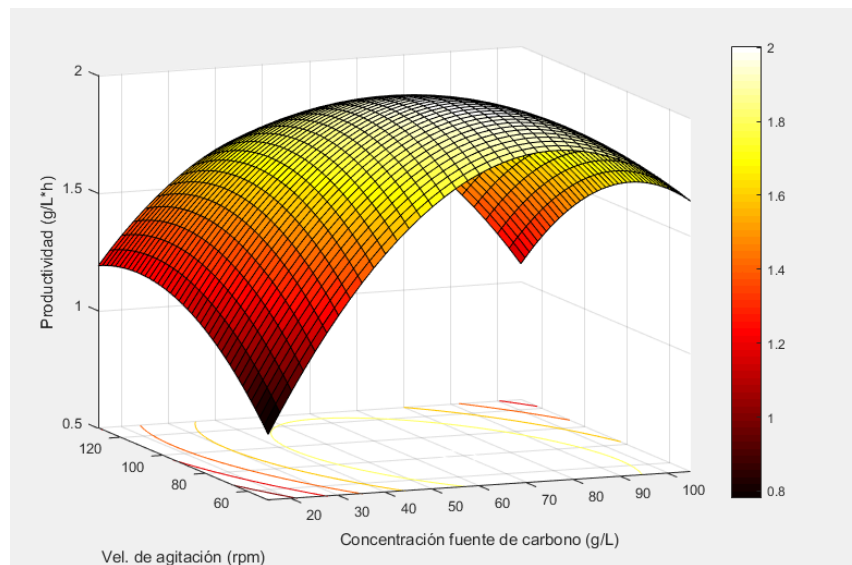


Figura 8. Superficie de respuesta medida como productividad.

$$Z = -0,980609 + 0,0528236 \cdot X + 0,0287919 \cdot Y - 0,0003028 \cdot X^2 - 0,000136667 \cdot X \cdot Y - 0,000119998 \cdot Y^2 \quad \text{(Ecuación 1)}.$$

Dónde: X= Concentración de la fuente de carbono (g/L); Y= Velocidad de agitación (rpm) y Z= Productividad (g/L*h)

Los valores óptimos encontrados con los cuales se alcanzó la máxima productividad fueron 69 g/L de la concentración de la fuente de carbono y 80 rpm de la velocidad de agitación, éstos valores fueron arrojados en la superficie de respuesta ajustada por el software *Statgraphics Centurion XVI*.

El coeficiente de determinación (R^2) fue de 80,00%. A partir de éste resultado se puede inferir que el porcentaje para predecir los resultados tiene un grado aceptable de confiabilidad teniendo en cuenta que es un modelo empírico obtenido de un trabajo experimental. Con el fin de validar la ecuación de la superficie de respuesta, se realizaron dos experimentos con valores de la concentración de la fuente de carbono y velocidad de agitación cercanos al punto óptimo encontrado en la región de máxima productividad. El primer experimento se desarrolló con 60 g/L de concentración y una agitación de 88 rpm, el segundo experimento se ejecutó con una concentración de 81 g/L y 80 rpm de agitación.

Tabla 7. Errores experimentales de productividad.

Experimento	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	Exp ⁴ . 1	Exp ⁵ . 2	Más productivo
Error (%)	0,10	1,67	10,38	9,16	4,58	4,59	6,73	7,38	5,49	4,68	9,83	14,53	19,50	14,40

En la Tabla 7 se observa que los errores experimentales más altos correspondieron tanto al experimento de mayor productividad como a los experimentos desarrollados para verificar la exactitud de la predicción de la ecuación. Esto indica que el modelo no tuvo un buen ajuste en la región de máxima productividad (ver Apéndice W).

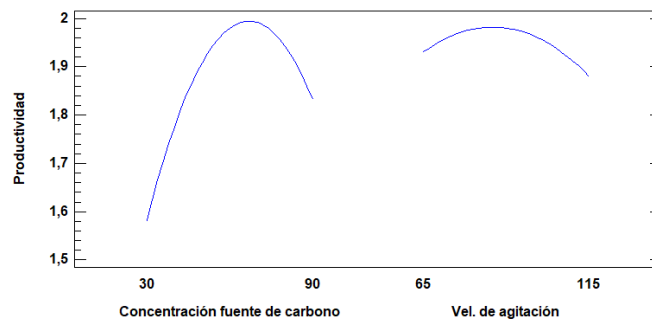


Figura 9. Efecto de la concentración de la fuente de carbono y velocidad de agitación sobre la productividad

⁴ Corresponde al primer experimento realizado con el fin de validar la ecuación de la superficie de respuesta. 60 g/L de concentración y una agitación de 88 rpm.

⁵ Corresponde al primer experimento realizado con el fin de validar la ecuación de la superficie de respuesta. 81 g/L de concentración y una agitación de 80 rpm.

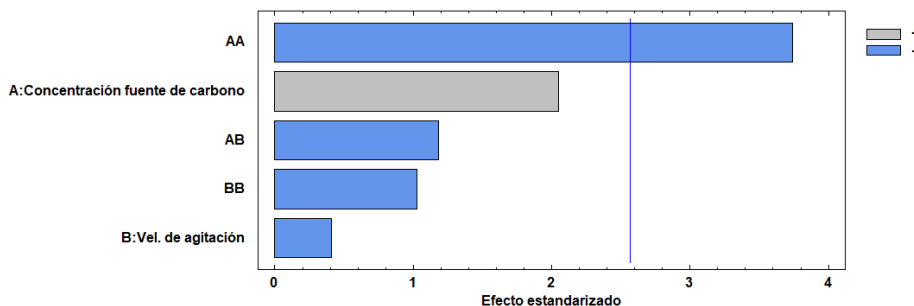


Figura 10. Diagrama de Pareto para la productividad.

En la Figura 9 se observa el comportamiento individual de la concentración de la fuente de carbono y la velocidad de agitación sobre la productividad. En la gráfica se aprecia que la concentración de la fuente de carbono tuvo una mayor influencia sobre la variable de respuesta comparada con la velocidad de agitación, ya que se obtuvo una curva más pronunciada a medida que hubo un cambio en la concentración de la fuente de carbono.

La Figura 10 muestra el efecto de las interacciones de la concentración de la fuente de carbono (A) y la velocidad de agitación (B) sobre la ecuación de la superficie de respuesta (Ecuación 1). En ésta se evidencia que la interacción cuadrática de la concentración de la fuente de carbono es la que más influencia tiene sobre el modelo.

3.5 Seguimiento de la fermentación con las condiciones óptimas encontradas para la máxima productividad de biomasa.

La Figura 11 ilustra las gráficas derivadas de la curva de crecimiento de *Saccharomyces cerevisiae* realizada a partir de los valores óptimos encontrados de la concentración de la fuente de carbono

(69 g/L) y velocidad de agitación (80 rpm), con los cuales se logró alcanzar la mayor productividad.

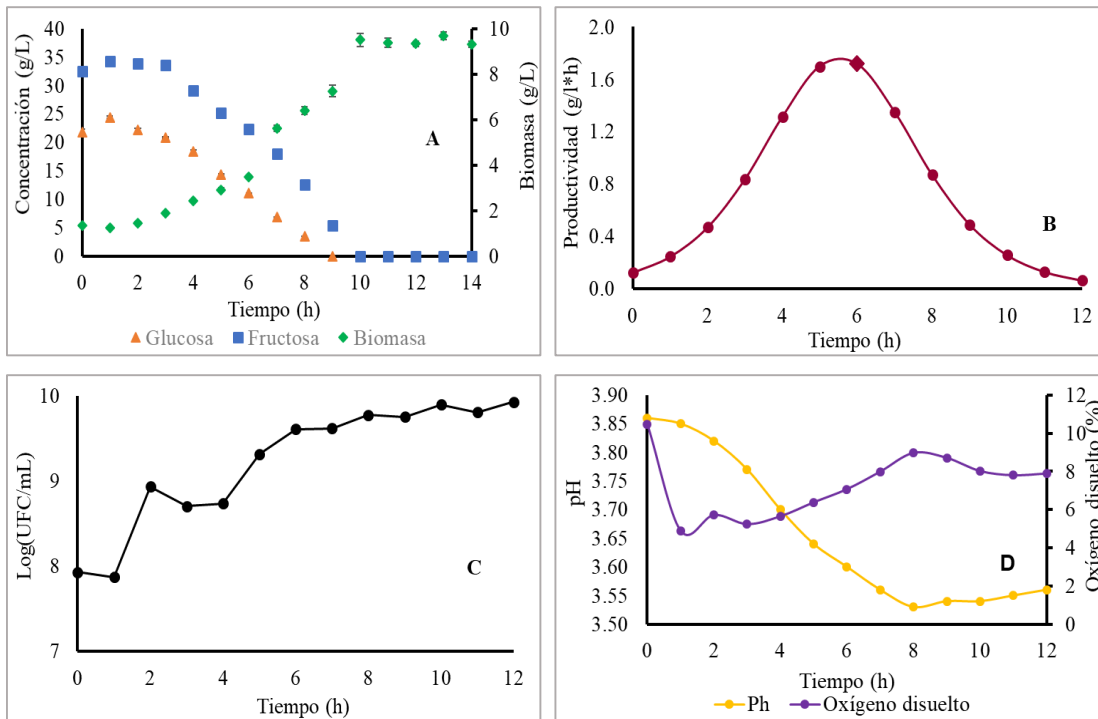


Figura 11. Consumo de la fuente de carbono y producción de biomasa (A), productividad (B), recuento en placa (C) y seguimiento de pH y oxígeno disuelto (D) del experimento con mayor productividad.

Como se observa en la figura 11.A, *Sacharomyces cerevisiae* presentó una fase de adaptación de una hora, seguida de una fase exponencial hasta llegar a la fase estacionaria en la hora 10 con un valor de concentración de biomasa de 10,10 g/L. La levadura consumió la glucosa y la fructosa de manera simultánea, en primera medida se agotó la glucosa en la hora 9 y posteriormente la fructosa en la hora 10. Su mayor productividad fue alcanzada en la hora 6 con un valor de 1,72 g/L*h (Figura 11.B). Las unidades formadoras de colonias comenzaron con una población de

8×10^6 UFC/mL y se mantuvieron en el orden de 10^8 UFC/mL a partir de la hora 5. En la Figura 11.C se puede observar un aumento de la población a lo largo de la fermentación, lo que indica que la biomasa obtenida posee una gran cantidad de células vivas. En cuanto al seguimiento del pH, éste comenzó con un valor de 3,86 y fue decreciendo hasta llegar a su punto mínimo (3,53) y estabilización en la hora 8. El oxígeno disuelto inició con un valor de 10,48%, con su pico mínimo en la hora uno con un valor de 4,89%, posteriormente fue aumentando hasta llegar a su punto máximo en la hora 8 con un valor de 8,97%, decreciendo nuevamente hasta llegar al final de la fermentación con un valor de 7,89%; aunque el oxígeno disuelto no tuvo muchos cambios, no llegó a un valor fijo de estabilización (Figura 11.D).

Estudios experimentales realizados con *Saccharomyces cerevisiae* a nivel de laboratorio evaluando diferentes fuentes de carbono, fueron realizados por Fajardo y Sarmiento (2007), quienes en su investigación encontraron a partir de la formulación de diferentes medios con la melaza de caña de azúcar, que la mayor productividad alcanzada por la levadura fue de 2,77 g/L*h con una concentración de la fuente de carbono de 78 g/L y una velocidad de agitación de 150 rpm. Por otra parte, Rivera *et al.* (2006), evaluaron la producción de biomasa en suero de queso para tres cepas de levaduras entre las cuales se encontraba *S. cerevisiae*; aunque ésta levadura no tuvo la mayor productividad de biomasa en esa matriz, el valor hallado fue de 0,14 g/L*h con una concentración de fuente de carbono de 20 g/L y una velocidad de agitación de 300 rpm. Cardozo y Moreno (2012) reportaron en su investigación como mejor productividad alcanzada por *S. cerevisiae* un valor de 0,734 g/L*h, utilizando como fuente de carbono la melaza de caña de azúcar con una concentración de 260 g/L y una velocidad de agitación de 150 rpm.

Al comparar los resultados reportados por los autores anteriormente mencionados, con los obtenidos en la presente investigación, puede verse evidenciado el gran potencial que tienen los lixiviados de mucílago de cacao para ser empleados como materia prima para la generación de biomasa.

4 CONCLUSIONES

Los lixiviados de mucílago de cacao tienen un gran potencial para ser empleados en la producción de *Saccharomyces cerevisiae*, debido a que presentan un alto contenido de carbohidratos y proteína, 13,83% y 0,27% respectivamente. Esto los convierte en una materia prima atractiva ya que, contribuye a una disminución de un problema medioambiental al tiempo que se utiliza para la producción de levaduras que pueden ser utilizadas en el proceso del beneficio del cacao.

De acuerdo con los resultados obtenidos, el nitrógeno presente en los lixiviados de mucílago de cacao no se encuentra en una forma asimilable por *Saccharomyces cerevisiae*, lo que genera un crecimiento lento de la levadura y una menor productividad de biomasa (0,26 g/L*h) respecto al medio formulado con la adición de la fuente de nitrógeno (1,39 g/L*h).

Los puntos extremos del diseño de experimentos formulado (concentración de la fuente de carbono y velocidad de agitación), dieron lugar a las menores productividades de biomasa obtenidas.

La productividad alcanzada por *Saccharomyces cerevisiae* en el punto óptimo fue de 2,00 g/L*h según la superficie de respuesta, ésta se logró en la región central con una combinación de 69 g/L y 80 rpm. Además, se encontró que el efecto de la concentración de la fuente de carbono tiene una influencia más significativa que la velocidad de agitación sobre la productividad de biomasa.

5 RECOMENDACIONES

Desarrollar estudios que permitan proponer un método para la cuantificación rápida y económica del contenido de azúcares fermentables de los lixiviados, dado que los cambios de cosecha tienen un impacto en el inicio de las fermentaciones.

Experimentar con la adición de otras fuentes de nitrógeno de bajo costo, tales como la urea y sales de amonio.

Desarrollar un diseño de experimentos en la región de máxima productividad de la presente investigación con el fin de optimizar la superficie de respuesta.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alaniz, E., Arvizú, S., & González, K. (2013). *Producción de postres y vinagres a partir de exudado de cacao en la cooperativa de servicios múltiples "Ríos de agua viva, 21 de junio, municipio Rancho Grande Matagalpa"* (Tesis de pregrado). Universidad Nacional de Ingeniería, Estelí, Nicaragua.
- Anvoh, K., Zoro, A., & Gnakri, D. (2009). Production and characterization of juice from mucilage of cocoa beans and its transformation into marmalade. *Pakistan Journal of nutrition*, 8(2), 129-133.
- Arguello Moreta, F., & Villagómez García, S. (2013). Optimización y aprovechamiento del residuo (exudado del mucílago) de la almendra fresca del cacao (*Theobroma cacao* L.) CCN51 en la elaboración de vinagre. *Tsafiqui, revista de investigación científica*, (4), 8-19.
- Arnaíz Franco, C., Isac Oria, L., Lebrato Martínez, J. (2000). Determinación de la biomasa en procesos biológicos. Métodos directos e indirectos. *Tecnología del agua*, 20(205), 45-52.
- Balladares, C. (2015). *Caracterización físico-química de los lixiviados del cacao y café del litoral ecuatoriano, como potenciales fuentes de producción de bioetanol* (Tesis doctoral). Universidad de las palmas de gran canaria, Las Palmas de Gran Canaria, Ecuador.
- Buitrago Estrada, J., & Tenjo Camacho, 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.
- Cabello, A. (2018). *La importancia del nitrógeno para las levaduras*. [citado en 27 septiembre de 2018]. Disponible en Internet: <<http://vinisfera.com/r/archivo/6595>>.
- Cardozo M., & Moreno, J. (2012). *Diseño y optimización de un medio de cultivo a base de melaza de caña para la producción de biomasa a partir de *Saccharomyces cerevisiae** (Tesis de pregrado). Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá, Colombia

- Corzo, M. (2010). *Caracterización, funcionalidad tecnológica y bioactividad de proteínas lácteas glicosiladas vía reacción de Maillard* (Tesis doctoral). Universidad autónoma de Madrid, Madrid, España.
- Dall Cortivo, P., *et al.* (2018). Fermentation of oat and soybean hul hydrolyzates into ethanol and xilitol by recombinat industrial strains of *Saccharomyces cerevisiae* under diverse oxygen enviroments. *Industrial crops & products*, 113, 10-18.
- De Martín Barry, A. *Control del metabolismo de Saccharomyces cerevisiae en la síntesis de glutación* (Tesis doctoral). Universidad de Granada, Granada, España.
- Durango Londoño, L. (2007). *Evaluación y escalamiento de la producción de levaduras nativas tipo Saccharomyces spp. a nivel de laboratorio* (Tesis de pregrado). Universidad EAFIT, Medellín, Colombia.
- Fajardo Castillo, E., & Sarmiento Forero, S. (2007). *Evaluación de la melaza de caña como sustrato para la producción de Saccharomyces cerevisiae* (Tesis de pregrado). Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá, Colombia.
- FEDECACAO. (2014). *Cacaocultura renovada*. p. 3.
- FEDECACAO. (2017).
- Galvis Jacome, M. (2009). *Estudio del proceso de fermentación de glucosa para la producción de bioethanol a partir de levaduras nativas* (Tesis de pregrado). Universidad Industrial de Santander, Bucaramanga, Colombia.
- Geiser, J., *et al.* (2014). *Saccharomyces cerevisiae*. Salem Press Encyclopedia of.
- Gómez, E., Estrada, A., Bacilio, J., Castañeda, A., Alvarado, E., Valverde, L., *et al.* (2015). Evaluación de harina de soya como fuente primaria en la producción de biomasa de *Saccharomyces cerevisiae*. *Agroindustrial science*, 5(1), 49-59.
- Held, P. (2010). Monitoring grow of beer breawing strains of *Saccharomyces cervisiae*. Biotek.

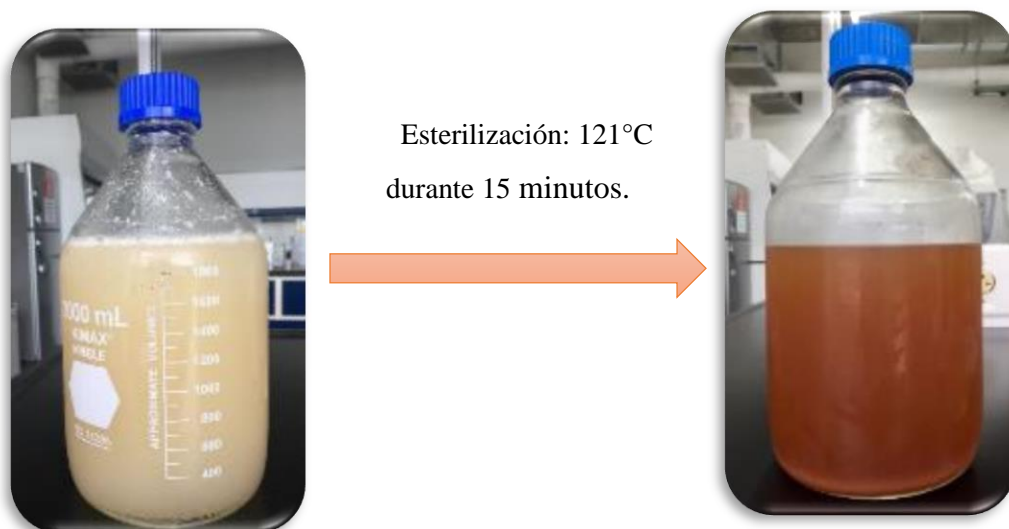
- Jeréz, L. (2008). *Control de la inversión de la sacarosa en el proceso de elaboración de jarabe simple de bebidas carbonatadas* (Tesis de pregrado). Universidad de San Carlos de Guatemala, San Carlos, Guatemala.
- Jiménez, F., & Bonilla, M. (2012). *Aprovechamiento de mucílago y maguey de cacao (Theobroma cacao) fino de aroma para la elaboración de mermelada* (Tesis de grado). Universidad estatal de Bolívar, Guanujo, Ecuador.
- Leveau, J., & Bouix, M. (2006). *Microbiología industrial*. Washington, Estados Unidos: Acribia.
- López, V. (2015). Procesamiento del cacao. Centro nacional de tecnología química. p. 2.
- Márquez, A., & Salazar, E. (2015). *Análisis de los niveles de desperdicio del mucílago de cacao y su aprovechamiento como alternativa de biocombustible* (Tesis de pregrado). Universidad Estatal de Milagro, Milagro, Ecuador.
- Mateos, P. (2018). *Nutrición de microorganismos industriales*. [citado en 27 septiembre de 2018]. Disponible en Internet: <file:///C:/Users/personal/Downloads/05NutriciondeMI.pdf>.
- Miljkovic, M. (2009). *Carbohydrates: Syntesis, Mechanisms, and Stereoelectronic Effects*. Nueva York. Estados Unidos. Springer Science & Business.
- Ortíz, Á., et al. (2008). *Evaluación de la capacidad probiótica “in vitro” de una cepa nativa de Saccharomyces cerevisiae*. En: *Microbiología industrial*. p. 139-140.
- Ortíz, K., & Álvarez, R. (2015). *Efecto del vertimiento de subproductos del beneficio de cacao (Theobroma caca L.) sobre algunas propiedades químicas y biológicas en los suelos de una finca cacaotera, municipio de Yaguará (Huila, Colombia)*. En: *Boletín científico, centro de museos, museo de historia natural*. p 67.
- Papagianni, M., Boonpooh, Y., Matthey, M., Kristiansen, B. (2007). Substrate inhibition kinetics of *Saccharomyces cerevisiae* in fed-batch cultures operated at constant glucose and maltose concentration levels. *J Ind Microbiol Biotechnol*, 34, 301-309.

- Paucar, L. (2013). [Diapositivas]. Nuevo Chimbote, p. 5.
- Peña, C., & Arango, R. (2008). *Evaluación de la producción de etanol utilizando cepas recombinantes de Saccharomyces cerevisiae a partir de melaza de caña de azúcar*.
- Perea Villamil, A., Martínez Guerrero, N., Aranzazu Hernández, F., & Cadena Cala, T. (2017). Características de calidad del cacao de Colombia: catálogo de 26 cultivares (2 ed). Universidad Industrial de Santander, Federación Nacional de Cacaoteros (FEDECACAO), Bogotá D.C, Colombia.
- Quimbita, F., & Rodríguez, P., Vera, E. (2013). *Revista tecnológica ESPOL*. 26(1), 13.
- Rementeria, A., et al. (2006). Selección e implementación de cepas de levadura del género *Saccharomyces* en la producción de vinos de la Denominación de Origen (DO) chacolí de vizcaya/Bizkaiko Txakolina. *Revista iberoamericana de micología*. 23(1), 224-232.
- Rivera, W., et al. (2006). Selección de una levadura para la producción de biomasa: Crecimiento en suero de queso. *Agronomía mesoamericana*, 17(2), 151-160.
- Rubio, A., Hernández, M., Aguirre A & Poutou R. Identificación preliminar *in vitro* de propiedades probióticas en cepas de *S. cerevisiae*. *ReMVZ Córdoba*, 13(1).
- Solieri, L., & Giudice, P. (2009). Other tropical fruit vinegars. *Vinegars of the World*. Milan: Springer. 262.
- Suárez, C., et al. (2016). *Levadura Saccharomyces cerevisiae y la producción de alcohol*. Revisión bibliográfica. ICIDCA. Sobre los derivados de la caña de azúcar [en línea]. Disponible en: <<http://www.redalyc.org/pdf/2231/223148420004.pdf>>
- Superintendencia de Industria y Comercio. (2017).
- Vallejo, C., et al. (2016). Utilización del mucílago de cacao, tipo nacional y trinitario, en la obtención de jalea. *Espamciencia*.

- Visintin, S., et al. (2017). Impact of *Saccharomyces cerevisiae* and *Torulaspota delbrueckii* starter cultures on cocoa beans fermentation. *International journal of food microbiology*, 257, 31 – 40.
- Zhang, C., et al. (2018). *Production of sesquiterpenoid zerumbone from metabolic engineered Saccharomyces cerevisiae*. Ingeniería metabólica.
- Zumbado, W., et al. (2006). Selección de una levadura para la producción de biomasa: Crecimiento en suero de queso. *Agronomía mesoamericana*, 17(2), 151-160.

APÉNDICES

APÉNDICE A. Lixiviados de mucílago de cacao sin esterilizar y estériles.



APÉNDICE B. Preparación de la muestra y condiciones cromatográficas para la cuantificación de azúcares (HPLC).

A 2 g de la muestra sin esterilizar y esterilizada, se le adicionaron 4 ml de agua acidificada con una concentración 10 mM de ácido sulfúrico, seguidamente la muestra se homogenizó en vortex durante 2 minutos, posteriormente se introdujo en el equipo de ultrasonido por 10 minutos y al salir de éste fue centrifugada a 3000 rpm durante 10 minutos. Finalmente, se midió el volumen del sobrenadante y con una jeringa se extrajeron aproximadamente 2 ml que fueron llevados a un vial con septa mediante un filtro hidrofílico PVDF 0,45 μm para su posterior análisis en el equipo de HPLC.

PARÁMETROS	ESPECIFICACIONES
Columna	COREGEL 107-H 7,8 x 300 mm (8 μm)
Temperatura de la columna	30°C

Temperatura/ modo del detector RI	30°C/ Plus
Volumen de inyección	20 µL
Flujo	1,0 mL/min
Fase móvil	Agua acidificada con una concentración 8 mM de H ₂ SO ₄ . (modo isocrático)

APÉNDICE C. Fotografías del procedimiento para la adaptación y fermentación de *saccharomyces cerevisiae*.

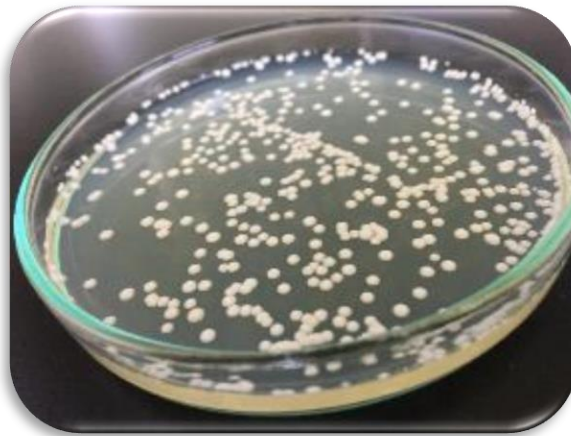


APÉNDICE D. Fotografía del método de peso seco para la estimación de la biomasa.



APÉNDICE E. Fundamento de la técnica de recuento en placa.

El recuento de microorganismos viables se fundamenta en la capacidad de dichas células viables de desarrollar una colonia visible en un medio de cultivo apropiado. En los recuentos en placa por siembra en superficie, se extiende un volumen de aproximadamente 0,1 ml de la suspensión sobre la superficie del medio de cultivo. Los resultados de los recuentos en placa se expresan como unidades formadoras de colonia (UFC) por unidad de volumen de la suspensión microbiológica. Para que el recuento sea estadísticamente significativo, el número de colonias deberá estar comprendido entre 30 y 300 colonias (Arnáiz, 2000).

APÉNDICE F. Vista macroscópica de *Saccharomyces cerevisiae* en medio agar Sabouraud.**APÉNDICE G.** Protocolo para formulación del medio a partir de los lixiviados de cacao.

1. Conocer el contenido de azúcares fermentables del lote de lixiviados que se va a emplear.

2. Mediante la ecuación $C_1V_1 = C_2V_2$, siendo:

C_1 : Concentración de azúcares fermentables del lote de lixiviado a emplear.

V_1 : El volumen que se desea encontrar.

C_2 : La concentración que se desea obtener.

V_2 : El volumen total de trabajo (600 ml).

3. El volumen que se obtiene mediante ésta ecuación, es la cantidad de lixiviados que se necesita para diluir agua + peptona.

4. La cantidad de agua + peptona es el volumen restante para completar el volumen final de trabajo, teniendo en cuenta que siempre se deben adicionar 6 g de peptona ya que se trabaja con una concentración de 10 g/L de ésta fuente de nitrógeno.

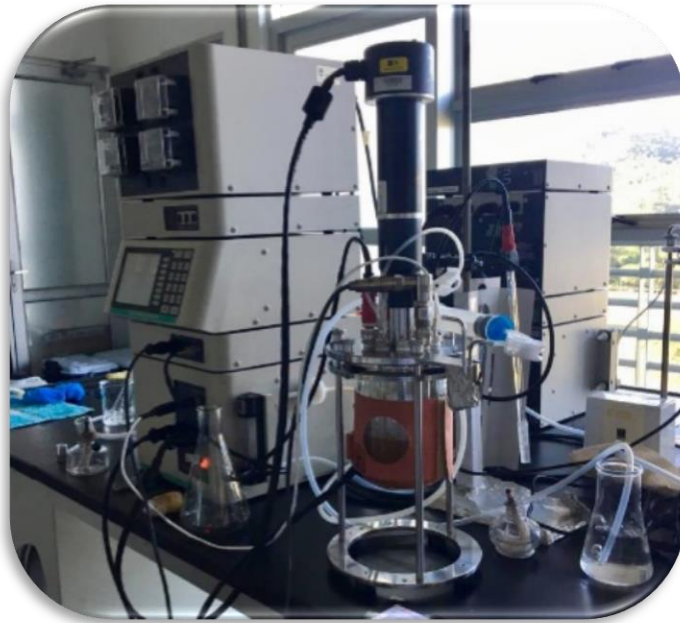
5. Debido a que el medio debe estar estéril y los lotes de lixiviados se esterilizan una vez se recolectan, el volumen de agua + peptona con el que se formulará el medio, debe esterilizarse también para poder ser mezclado con los lixiviados.

6. Una vez se tiene el medio, se procede a dispensarlo en los recipientes empleados para la fermentación manteniendo una relación 1/10. Éste procedimiento puede ser encontrado en la metodología, sección 1.2.4 de la segunda etapa (**¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.**, B-D).

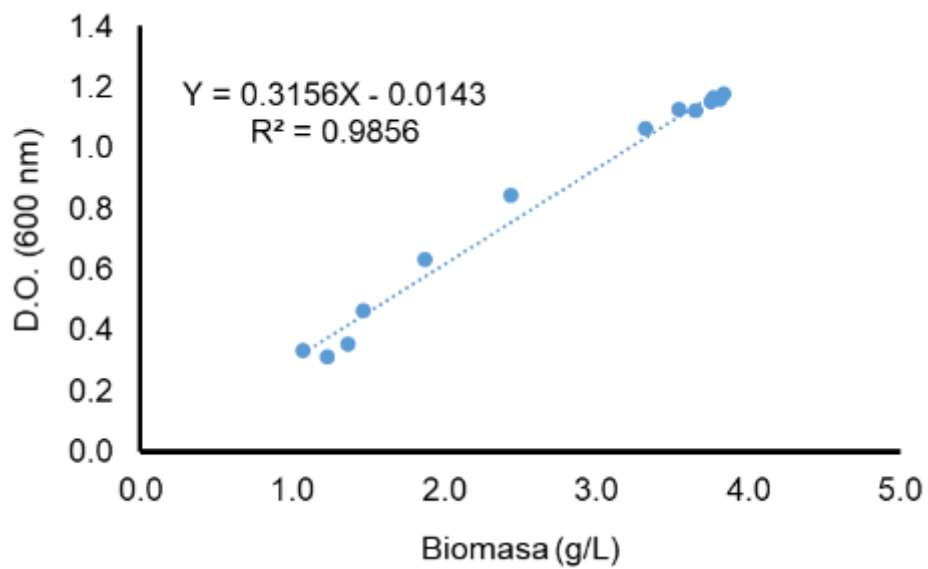
APÉNDICE H. Protocolo para el montaje del biorreactor BIOFLO 110 de 1 L de capacidad

1. Antes de cada fermentación, el vaso del biorreactor, las mangueras siliconadas de 1/4 de pulgada y 1/8 de pulgada, el tomador de muestras, los sensores de pH y oxígeno se deben esterilizar (121°C durante 15 minutos).
2. Para la esterilización el vaso debe contener agua con el fin de evitar que los sensores de pH y oxígeno se dañen.
3. Doce horas antes de iniciar la fermentación se debe calibrar el sensor de oxígeno. Esto se debe realizar retirando el agua del biorreactor e ingresando el medio de cultivo. La calibración se ejecuta de la siguiente manera: el valor inferior, el cual es cero en éste caso, se calibra desconectando el sensor del panel de control hasta que éste llegue al valor deseado y se estabilice; cuando esto ocurre, se vuelve a conectar el sensor. Para el valor superior, el cual es 100 en éste caso, se establece un valor de agitación alto (400 rpm) y un flujo de aire 1 L/min hasta alcanzar su estabilización.
4. Pasadas las doce horas, se introduce el pre-inóculo al vaso del biorreactor para iniciar la fermentación.

APÉNDICE I. Fotografía del montaje del biorreactor *new Brunswick bioflo 110*.



APÉNDICE J. Curva de correlación entre la densidad óptica y la biomasa.




APÉNDICE K. Procedimiento para obtener los valores de productividades.

Inicialmente se selecciona la variable de respuesta (productividad), posteriormente se definen las variables independientes (concentración de carbono y velocidad de agitación) y sus límites de medición. Inmediatamente, se selecciona el diseño de experimentos y se especifica el tipo de modelo al que se quiere ajustar (en éste caso cuadrático), el programa por defecto selecciona las corridas que se deben desarrollar. Una vez se efectúan éstas corridas, para cada una de ellas se obtiene una curva de biomasa con respecto al tiempo, las cuales son ajustadas en el *software CurveExpert Basic 2.1.0* que proporciona una serie de modelos de los cuales se escoge el más apropiado para el crecimiento de la levadura (*Dose-Response Logistic*). Después de encontrado éste modelo, se saca la derivada de la función con respecto al tiempo en cada punto generando una gráfica tipo campana de gauss, el punto máximo de cada campana será la mayor productividad obtenida en esa curva. Finalmente, en el software *Statgraphics Centurion XVI* se ingresan los valores de máxima productividad de cada experimento y se seleccionan las tablas y gráficas que se desean obtener.

APÉNDICE L. Análisis bromatológico de los lotes de lixiviados recolectados.

Lote 1



LABORATORIO DE ALIMENTOS
CICTA


INFORME DE ENSAYO

FECHA: 2019-05-20
 NOMBRAMIENTO: Servicio Fito-Salud
 DIRECCIÓN: Av. 2 de Mayo y Batallas 5668 LUS
 TELÉFONO: 2022 76949
 CÓDIGO DE LA MUESTRA: 6406-16
 PRODUCTO: Mielado #3
 FECHA DE RECEPCIÓN: 2019-05-20
 REALIZACIÓN DEL ANÁLISIS: 2019-05-21 a 2019-05-22

DESCRIPCIÓN DEL ANÁLISIS:

- La humedad se determinó por método de secado en vacío según la metodología OOMEC01, en análisis de humedad en alimentos.
- La determinación de cenizas se realizó por combustión según la metodología SORECH01, en análisis de cenizas en alimentos.
- La proteína fue analizada por el método de Kjeldahl, procedimiento interno referido SCMAPL01, en análisis de proteínas en alimentos.
- La determinación de grasas se realizó por extracción con solvente en vacío por Soxhlet según la metodología OOMEC02, en análisis de grasas en alimentos.
- La fibra cruda se determinó por métodos de fibra de la muestra desengrasada.
- Los sólidos totales (STO) y el sólido soluble fueron obtenidos respectivamente según la resolución 333 del 2011 del Ministerio de Protección Social.


LABORATORIO DE ALIMENTOS
Av. 2 de Mayo y Batallas, 5668 LUS, Cundinamarca, Colombia
Teléfono: (57) 6 55 98 64
www.cicta.gov.co



LABORATORIO DE ALIMENTOS
CICTA

TABLA 1. RESULTADOS DE ANÁLISIS BROMATOLÓGICO

PARAMETROS	UNIDAD	RESULTADO	MÉTODO DE ANÁLISIS
Humedad	g 100 g (H)	87,21	CICTA/01-01-01-Omniscopia
Cenizas	g 100 g (C)	5,36	CICTA/01-01-01-Omniscopia
Grasa	g 100 g (G)	0,6	CICTA/01-01-01-Omniscopia
Proteína	g 100 g (P)	0,27	CICTA/01-01-01-Omniscopia
Fibra cruda	g 100 g (F)	0,6	CICTA/01-01-01-Omniscopia
Carbohidratos totales	g 100 g (T)	15,97	--
Cenizas	mg/100 g (M)	55,71	--

REVISÓ Y APROBÓ:

 Valeria Rojas
 Coordinadora de LABS

NOTA: Este informe es válido únicamente para el uso que se le ha dado. No puede ser usado para otros fines. Reservados todos los derechos. © 2019 CICTA

Lote 2.

	LABORATORIO DE ALIMENTOS CICTA	INFORME DE ENSAYO	FOLIO 01
		Número: 432-18	Página 1 de 1

INFORME DE ENSAYO

FECHA: 2018-06-10
 NOMBRAMIENTO: Daniela Pita Sotillo
 DIRECCIÓN: Av 7 de la Piedad Cade 183
 TELÉFONO: 3212 1846

CÓDIGO DE LA MUESTRA: M431-18
 PRODUCTO: Maltado # 1
 FECHA DE RECEPCIÓN: 2018-05-24
 REALIZACIÓN DEL ANÁLISIS: 2018-06-08 a 2018-06-08

DESCRIPCIÓN DEL ANÁLISIS

- La humedad se determinó por método de secado en estufa siguiendo la metodología GOMEC 01 análisis de humedad en alimentos.
- La determinación de cenizas se realizó por valoración según la metodología GOMEC 01 análisis de cenizas en alimentos.
- La proteína fue analizada por el método de Kjeldahl, procedimiento menor volumen GOMEC 01 análisis de proteína en alimentos.
- La determinación de grasas se realizó por extracción con solvente en equipo Soxhlet siguiendo la metodología GOMEC 01 análisis de grasas en alimentos.
- La fibra cruda se determinó por métodos de fibra y fibra de la muestra desengrasada.
- Los carbohidratos totales y el valor calórico fueron calculados matemáticamente según la ecuación 331 del 2011 del Ministerio de Protección Social.

Laboratorio de Alimentos
 Km 2 vía al Páramo, sector U.S. Guaguará, Pedernales, Santander
 Teléfono: (7) 622 88 04
 cicta@icn.ula.ve

	LABORATORIO DE ALIMENTOS CICTA	INFORME DE ENSAYO	FOLIO 02
		Número: 432-18	Página 2 de 1

TABLA 1. RESULTADOS DE ANÁLISIS MUE-18

PARÁMETROS	UNIDAD	RESULTADO	MÉTODO DE ANÁLISIS
Humedad	g/100 g (%)	81,49	GOMEC 01 - Gravimétrico
Cenizas	g/100 g (%)	0,20	GOMEC 01 - Gravimétrico
Grasa	g/100 g (%)	n.d	GOMEC 01 - Gravimétrico Soxhlet
Proteína	g/100 g (%)	0,22	GOMEC 01 - Volumétrico Kjeldahl
Fibra cruda	g/100 g (%)	n.d	Método de fibra y fibra desengrasada
Carbohidratos totales	g/100 g (%)	14,90	-
Calorías	kcal/100 g (kcal)	38,81	-

n.d = No detectado

REVISÓ Y APROBÓ

 MSc. Angie V. Rodríguez
 Químico P-32329
 Coordinador de Calidad

NOTA: Este informe de análisis constituye un documento de la propiedad intelectual del cliente. No puede ser utilizado para otros fines sin el consentimiento expreso del cliente. No se garantiza la exactitud de los resultados.

Para calcular el equivalente de Nitrógeno expresado como proteína se obtiene:
 $N \times 6,25 = \% \text{ Nitrógeno}$
 $\% \text{ N} = 0,22 \times 6,25$

Lote 3

	LABORATORIO DE ALIMENTOS CICTA	INFORME DE ENSAYO	FOLIO 01
		Número: 412-18	Página 1 de 1

INFORME DE ENSAYO

FECHA: 2018-07-11
 NOMBRAMIENTO: Daniela Pita Sotillo
 DIRECCIÓN: Av 7 de la Piedad Cade 183
 TELÉFONO: 3212 1846

CÓDIGO DE LA MUESTRA: M415-18
 PRODUCTO: Maltado # 1
 FECHA DE RECEPCIÓN: 2018-06-20
 REALIZACIÓN DEL ANÁLISIS: 2018-06-20 a 2018-07-03

DESCRIPCIÓN DEL ANÁLISIS

- La humedad se determinó por método de secado en estufa siguiendo la metodología GOMEC 01 análisis de humedad en alimentos.
- La determinación de cenizas se realizó por valoración según la metodología GOMEC 01 análisis de cenizas en alimentos.
- La proteína fue analizada por el método de Kjeldahl, procedimiento menor volumen GOMEC 01 análisis de proteína en alimentos.
- La determinación de grasas se realizó por extracción con solvente en equipo Soxhlet siguiendo la metodología GOMEC 01 análisis de grasas en alimentos.
- La fibra cruda se determinó por métodos de fibra y fibra de la muestra desengrasada.
- Los carbohidratos totales y el valor calórico fueron calculados matemáticamente según la ecuación 331 del 2011 del Ministerio de Protección Social.

Laboratorio de Alimentos
 Km 2 vía al Páramo, sector U.S. Guaguará, Pedernales, Santander
 Teléfono: (7) 622 88 04
 cicta@icn.ula.ve

	LABORATORIO DE ALIMENTOS CICTA	INFORME DE ENSAYO	FOLIO 02
		Número: 412-18	Página 2 de 1

TABLA 1. RESULTADOS DE ANÁLISIS MUE-18

PARÁMETROS	UNIDAD	RESULTADO	MÉTODO DE ANÁLISIS
Humedad	g/100 g (%)	81,88	GOMEC 01 - Gravimétrico
Cenizas	g/100 g (%)	0,20	GOMEC 01 - Gravimétrico
Grasa	g/100 g (%)	n.d	GOMEC 01 - Gravimétrico Soxhlet
Proteína	g/100 g (%)	0,22	GOMEC 01 - Volumétrico Kjeldahl
Fibra cruda	g/100 g (%)	n.d	Método de fibra y fibra desengrasada
Carbohidratos totales	g/100 g (%)	14,35	-
Calorías	kcal/100 g (kcal)	40,20	-

n.d = No detectado

REVISÓ Y APROBÓ

 MSc. Angie V. Rodríguez
 Químico P-32329
 Coordinador de Calidad

NOTA: Este informe de análisis constituye un documento de la propiedad intelectual del cliente. No puede ser utilizado para otros fines sin el consentimiento expreso del cliente. No se garantiza la exactitud de los resultados.

Lote 4

	LABORATORIO DE ALIMENTOS - CICTA	FORMA DE ENSAYO	FOOTLE 01
		Nombre: 101-10	Página: 1 de 2

IMPORTE DE ENSAYO

FECHA: 2019-08-10
 NOMBRE EMPRESA: Danisa Pasa Uruguay
 DIRECCIÓN: 007 vía al Parque (Calle 10)
 TELÉFONO: 33072864
 CÓDIGO DE LA MUESTRA: 9434-01
 PRODUCTO: Mielagga #8
 FECHA DE RECEPCIÓN: 27/07/19
 REALIZACIÓN DEL ANÁLISIS: 27/08/19 a 27/08/19

DESCRIPCIÓN DEL ANÁLISIS

- La humedad se determina por medio de ensayo en estufa siguiendo la metodología COMEN 01 análisis de humedad en alimentos.
- La determinación de cenizas se realiza por calentamiento siguiendo la metodología COMEN 01 análisis de cenizas en alimentos.
- La proteína fue analizada por el método de Kjeldahl, procedimiento interno validado COMEN 01 análisis de proteína en alimentos.
- La determinación de grasa se realizó por extracción con solvente en estufa Soxhlet siguiendo la metodología COMEN 01 análisis de grasa en alimentos.
- La fibra cruda se determinó por métodos AOAC y fibra de la muestra desengrasada.
- Los carbohidratos solubles y el valor calórico fueron determinados indirectamente según la resolución 332 del 2011 del Ministerio de Protección Social.

Laboratorio de Alimentos
 Km 2 vía al Parque, sede U.S. Guayaquil, Tachuela, Tumbador
 Teléfono: (014) 25 00 01
 www.cicta.gov.uy

	LABORATORIO DE ALIMENTOS - CICTA	FORMA DE ENSAYO	FOOTLE 01
		Nombre: 101-10	Página: 1 de 2

TABLA 1. RESULTADOS DE ANÁLISIS 101-10

PARÁMETRO	UNIDAD	RESULTADO	MÉTODO DE ANÁLISIS
Humedad	g/100 g (N)	64,46	COMEN 01 - Grasa y Humedad
Cenizas	g/100 g (N)	0,30	COMEN 01 - Grasa y Humedad
Grasa	g/100 g (N)	0,05	COMEN 01 - Grasa y Humedad
Proteína	g/100 g (N)	0,30	COMEN 01 - Análisis de Nitrógeno
Fibra cruda	g/100 g (N)	1,01	Método AOAC y fibra de la muestra desengrasada
Carbohidratos solubles	g/100 g (N)	1,04	-
Calorías	kcal/100 g (N)	30,00	-

REVISÓ Y APROBÓ

MSc. ANITA M. MONTANARI
 Gabriela PIZARRO
 Coordinadora de Calidad

NOTA: ESTE INFORME DE RESULTADOS CORRESPONDE ÚNICAMENTE A LA MUESTRA ANALIZADA, EN FUNCIÓN DE LA FORMA Y TITULARIDAD DEPENDIENTE DE LA PRESENCIA DEL LABORATORIO

Lote 5.

	LABORATORIO DE ALIMENTOS - CICTA	FORMA DE ENSAYO	FOOTLE 01
		Nombre: 101-10	Página: 1 de 2

IMPORTE DE ENSAYO

FECHA: 2019-08-10
 NOMBRE EMPRESA: Danisa Pasa Uruguay
 DIRECCIÓN: Km 2 vía al Parque (Calle 10)
 TELÉFONO: 33072864
 CÓDIGO DE LA MUESTRA: 9434-10
 PRODUCTO: Mielagga #7
 FECHA DE RECEPCIÓN: 27/08/19
 REALIZACIÓN DEL ANÁLISIS: 27/08/19 a 27/08/19

DESCRIPCIÓN DEL ANÁLISIS

- La humedad se determinó por medio de ensayo en estufa siguiendo la metodología COMEN 01 análisis de humedad en alimentos.
- La determinación de cenizas se realizó por calentamiento siguiendo la metodología COMEN 01 análisis de cenizas en alimentos.
- La proteína fue analizada por el método de Kjeldahl, procedimiento interno validado COMEN 01 análisis de proteína en alimentos.
- La determinación de grasa se realizó por extracción con solvente en estufa Soxhlet siguiendo la metodología COMEN 01 análisis de grasa en alimentos.
- La fibra cruda se determinó por métodos AOAC y fibra de la muestra desengrasada.
- Los carbohidratos solubles y el valor calórico fueron determinados indirectamente según la resolución 332 del 2011 del Ministerio de Protección Social.

Laboratorio de Alimentos
 Km 2 vía al Parque, sede U.S. Guayaquil, Tachuela, Tumbador
 Teléfono: (014) 25 00 01
 www.cicta.gov.uy

	LABORATORIO DE ALIMENTOS - CICTA	FORMA DE ENSAYO	FOOTLE 01
		Nombre: 101-10	Página: 1 de 2

TABLA 1. RESULTADOS DE ANÁLISIS 101-10

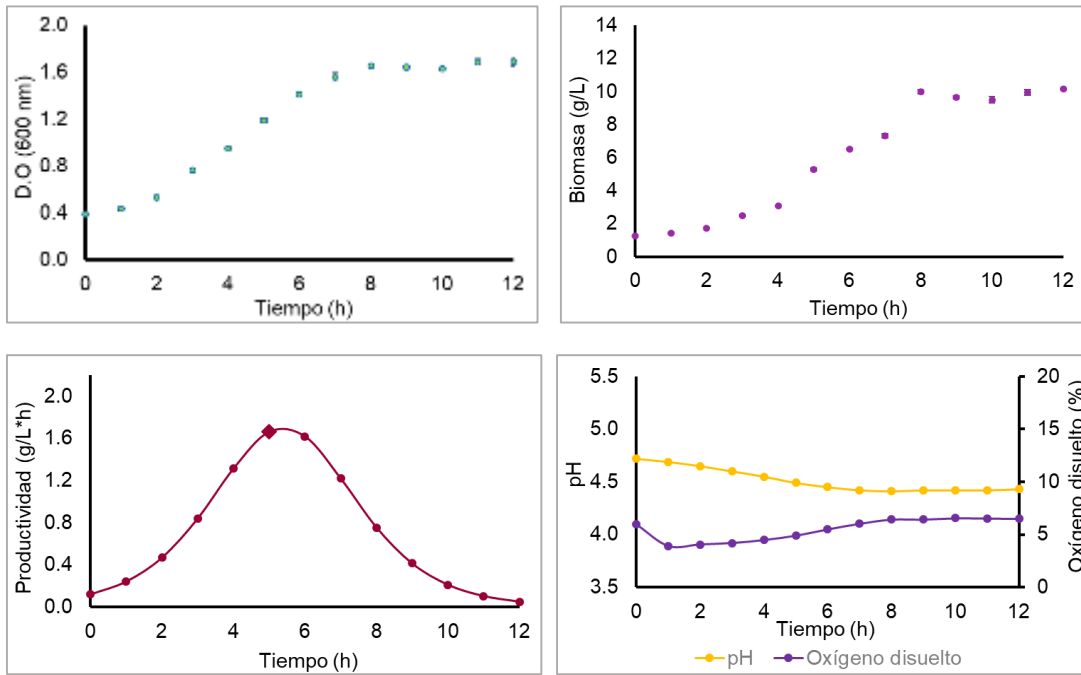
PARÁMETRO	UNIDAD	RESULTADO	MÉTODO DE ANÁLISIS
Humedad	g/100 g (N)	65,00	COMEN 01 - Grasa y Humedad
Cenizas	g/100 g (N)	0,51	COMEN 01 - Grasa y Humedad
Grasa	g/100 g (N)	0,04	COMEN 01 - Grasa y Humedad
Proteína	g/100 g (N)	0,34	COMEN 01 - Análisis de Nitrógeno
Fibra cruda	g/100 g (N)	1,04	Método AOAC y fibra de la muestra desengrasada
Carbohidratos solubles	g/100 g (N)	1,03	-
Calorías	kcal/100 g (N)	34,00	-

REVISÓ Y APROBÓ

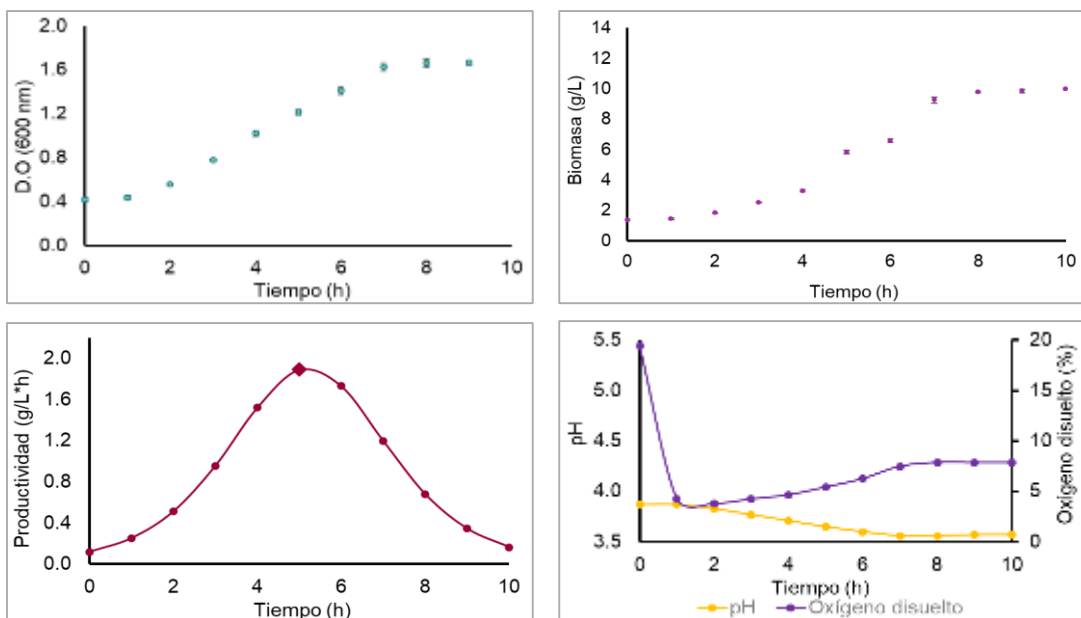
MSc. ANITA M. MONTANARI
 Gabriela PIZARRO
 Coordinadora de Calidad

NOTA: ESTE INFORME DE RESULTADOS CORRESPONDE ÚNICAMENTE A LA MUESTRA ANALIZADA, EN FUNCIÓN DE LA FORMA Y TITULARIDAD DEPENDIENTE DE LA PRESENCIA DEL LABORATORIO

APÉNDICE M. Gráficas obtenidas del experimento 1 (concentración de la fuente de carbono: 60 g/L, velocidad de agitación: 125,36 rpm)



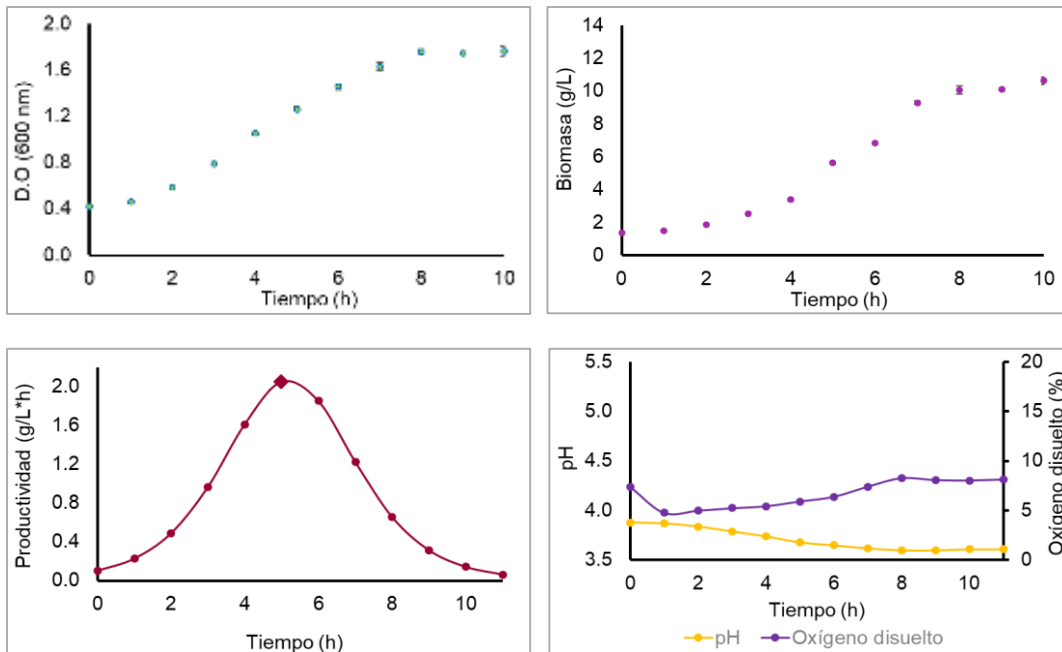
APÉNDICE N. Gráficas obtenidas del experimento 2 (concentración de la fuente de carbono: 60 g/L, velocidad de agitación: 90 rpm)



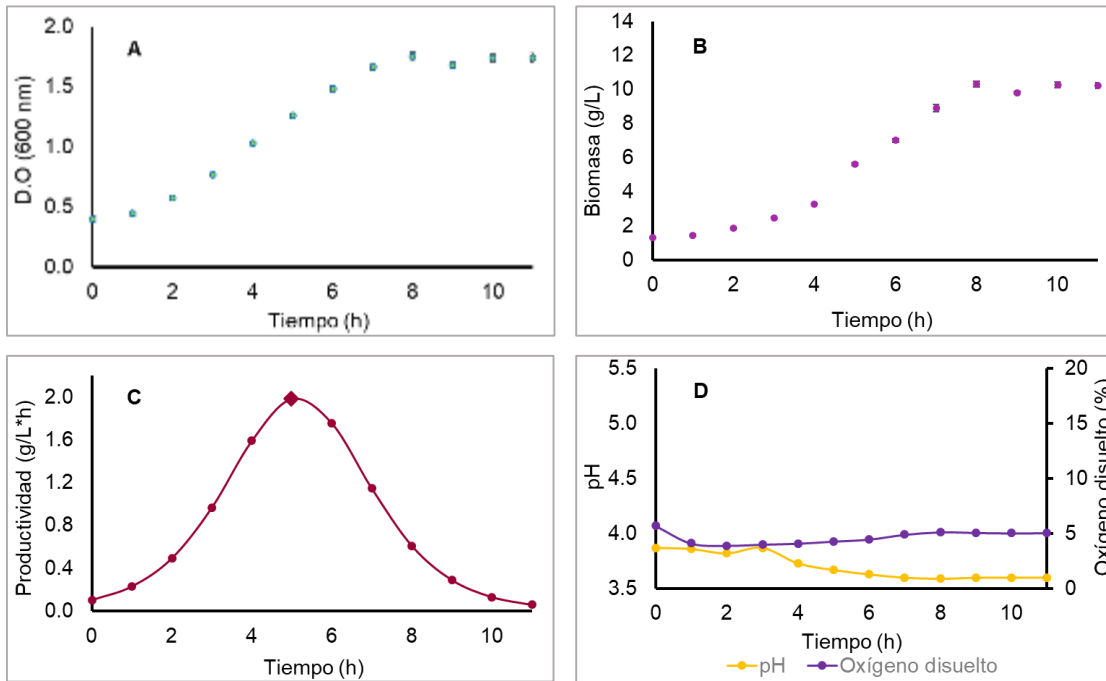
APÉNDICE O. Gráficas obtenidas del experimento 3 (concentración de la fuente de carbono: 17,56 g/L, velocidad de agitación: 90 rpm)



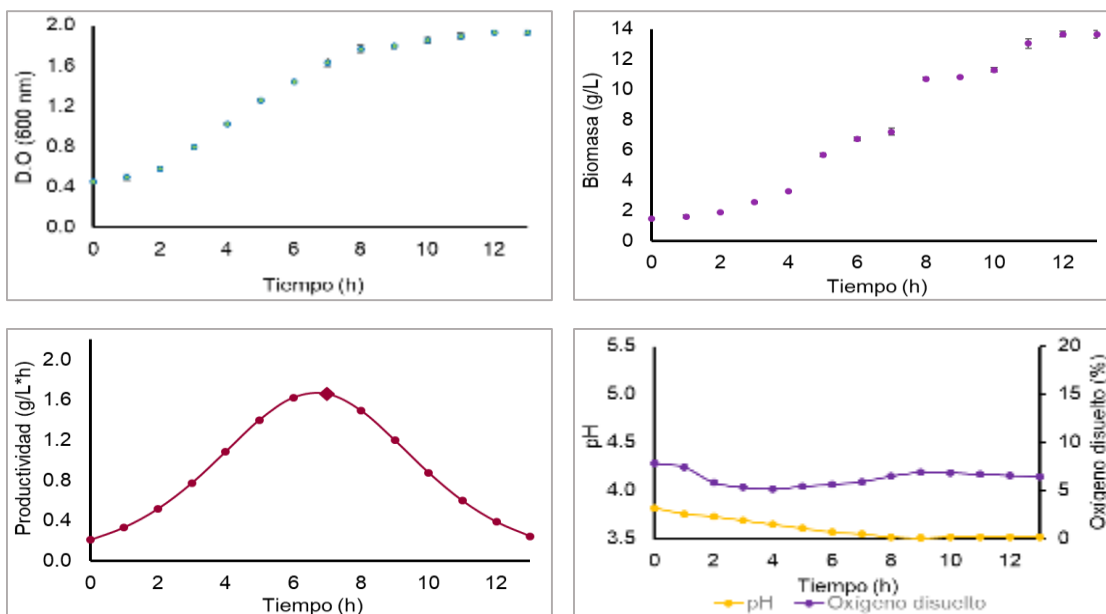
APÉNDICE P. Gráficas obtenidas del experimento 4 (concentración de la fuente de carbono: 60 g/L, velocidad de agitación: 54,65 rpm)



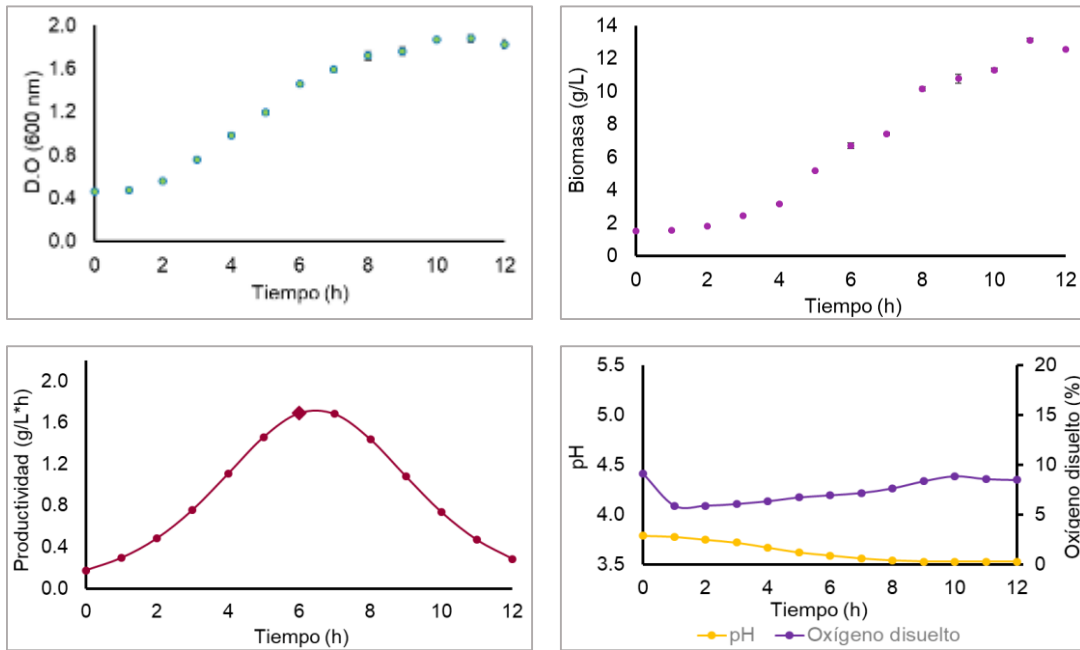
APÉNDICE Q. Gráficas obtenidas del experimento 5 (concentración de la fuente de carbono: 60 g/L, velocidad de agitación: 90 rpm)



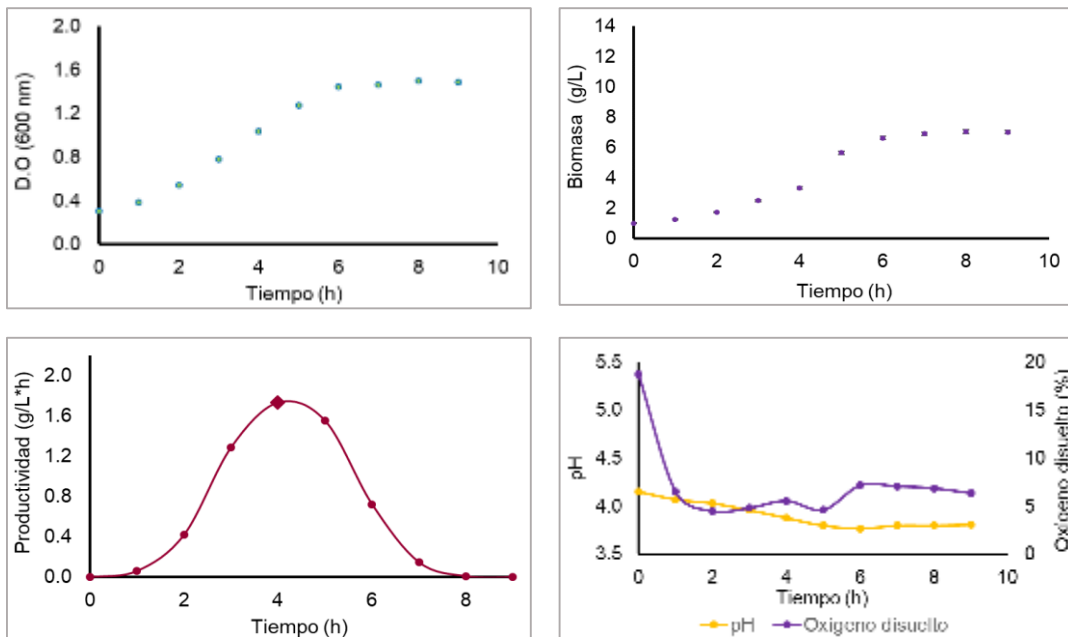
APÉNDICE R. Gráficas obtenidas del experimento 6 (concentración de la fuente de carbono: 90 g/L, velocidad de agitación: 115 rpm)



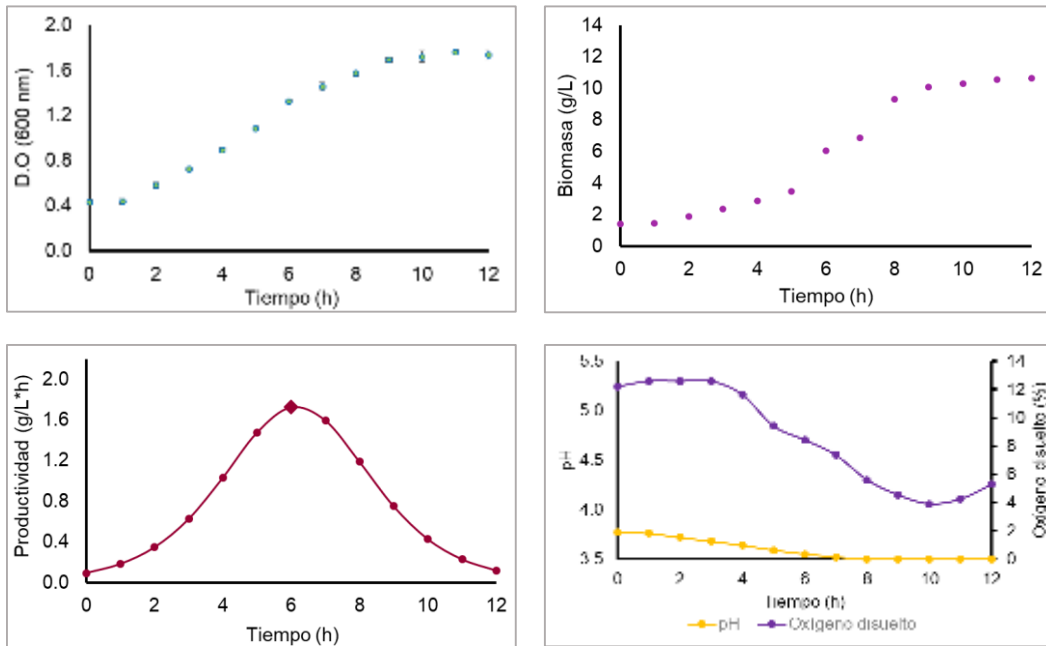
APÉNDICE S. Gráficas obtenidas del experimento 7 (concentración de la fuente de carbono: 90 g/L, velocidad de agitación: 65 rpm)



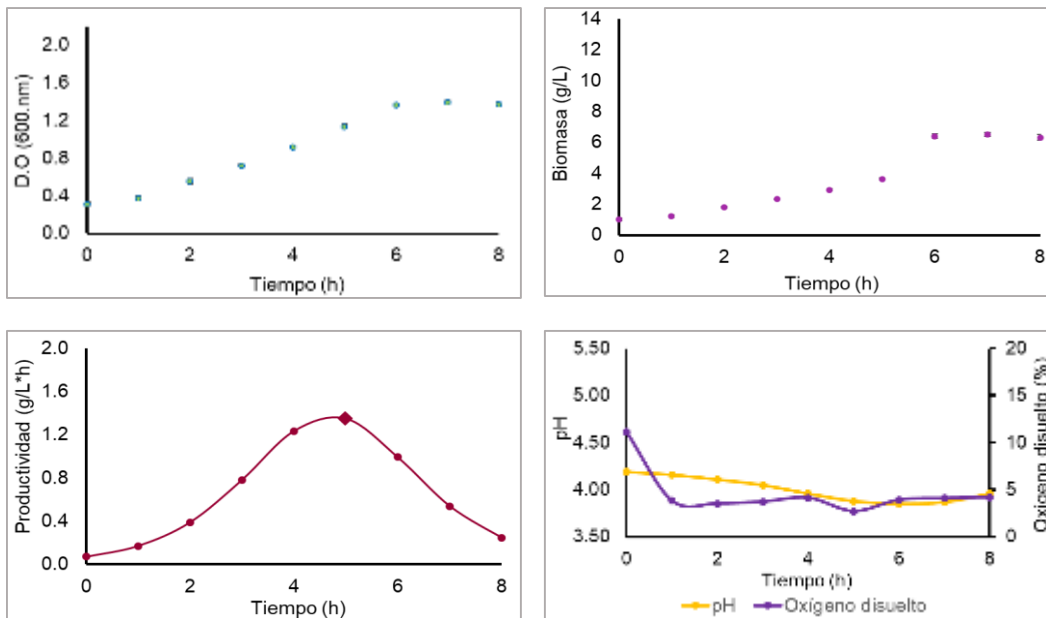
Apéndice T. Gráficas obtenidas del experimento 8 (concentración de la fuente de carbono: 30 g/L, velocidad de agitación: 115 rpm)



APÉNDICE U. Gráficas obtenidas del experimento 10 (concentración de la fuente de carbono: 102,43 g/L, velocidad de agitación: 90 rpm)



APÉNDICE V. Gráficas obtenidas del experimento 11 (concentración de la fuente de carbono: 30 g/L, velocidad de agitación: 65 rpm)



APÉNDICE W. Errores experimentales de productividad.

Concentración de la fuente de carbono (g/L)	Velocidad de agitación (rpm)	Productividad Experimental (g/L*h)	Productividad teórica (g/L*h)	ERROR (%)
60,00	90,00	1,98	1,98	0,08
90,00	115,00	1,66	1,63	1,80
90,00	65,00	1,69	1,89	10,24
30,00	115,00	1,73	1,58	9,03
17,57	90,00	1,20	1,26	4,68
60,00	90,00	2,07	1,98	4,57
102,43	90,00	1,72	1,61	6,93
60,00	125,36	1,66	1,79	7,40
30,00	65,00	1,35	1,43	5,48
60,00	90,00	1,89	1,98	4,70
60,00	54,64	2,05	1,87	9,94
81,00	80,00	1,68	1,96	14,47
60,00	88,00	1,59	1,98	19,52
69,00	80,00	1,72	2,00	14,37