



UNIVERSIDAD
DE PIURA

REPOSITORIO INSTITUCIONAL
PIRHUA

DESARROLLO DE UN MODELO MATEMÁTICO PARA LA FERMENTACIÓN DEL CACAO CRIOLLO BLANCO

Robinson López-Monzón

Piura, junio de 2016

FACULTAD DE INGENIERÍA

Máster en Ingeniería Mecánico-Eléctrica con Mención en Automática y
Optimización

López, R. (2016). *Desarrollo de un modelo matemático para la fermentación del cacao criollo blanco* (Tesis de Máster en Ingeniería Mecánico-Eléctrica con Mención en Automática y Optimización). Universidad de Piura. Facultad de Ingeniería. Piura, Perú.



Esta obra está bajo una [licencia](#)
[Creative Commons Atribución-](#)
[NoComercial-SinDerivadas 2.5 Perú](#)

[Repositorio institucional PIRHUA – Universidad de Piura](#)

UNIVERSIDAD DE PIURA

FACULTAD DE INGENIERIA



“Desarrollo de un Modelo Matemático para la Fermentación del Cacao Criollo Blanco”.

Tesis para optar el grado de

Master en Ingeniería Mecánico Eléctrica

ING. ROBINSON LÓPEZ MONZÓN

Asesor:

Dr. William Ipanaqué Alama.

Piura, Junio 2016.

A Dios.

Por haberme permitido llegar hasta este punto
y haberme dado salud para lograr mis objetivos,
además de su infinita bondad y amor.

A mi madre.

Por haberme apoyando en todo momento,
sus consejos, sus valores, las desveladas, los cafés,
la motivación constante
y sobre todo por su amor incondicional

Prólogo

La producción de cacao orgánico en Piura tiene un fuerte impacto, por su atractivo en el mercado internacional (las exportaciones de cacao han crecido 24% en los últimos dos años) gracias a su reconocida calidad. No obstante los procesos post-cosecha, fermentación y secado, son aún artesanales y existe poca tecnificación, así como carencia innovación. El proceso de fermentación es el responsable de gran parte de las características organolépticas del cacao, y por ello se han realizado numerosos estudios de caracterización química y microbiana para poder entender los factores dominantes que promueven las propiedades del cacao.

Actualmente aunque se ha logrado mejorar las técnicas usadas por los productores de cacao en nuestro país, aún predomina la fermentación en cajones de madera. Este procedimiento demanda un “expertise” profundo para identificar los tiempos de remoción adecuados, que varían en función del tipo de cacao (los estudios difieren en este valor debido a que el cacao de cada zona se caracteriza por diferentes concentraciones iniciales de microorganismos y compuestos químicos) y las características climáticas. Sin embargo al margen de las buenas prácticas realizadas, es común encontrar problemas de temperatura no uniforme a lo largo del cajón de fermentación y distribución de oxígeno mayormente concentrada en las áreas cercanas a las esquinas de las cajas y los agujeros. Estos puntos por lo general tienen una acidez y temperatura menor al resto de la masa fermentativa, propiciando el crecimiento de hongos.

Esta problemática de extensión nacional y el escenario de crecimiento actual del cacao de nuestro país han motivado a la investigación presentada, la cual ha logrado ser ejecutada gracias a la participación del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONCYTEC), al Programa Nacional de Innovación para la Competitividad y Productividad, Inóvate Perú a través del proyecto 145-FINCYT- IA-2013. Así como la asesoría y apoyo del Laboratorio de Sistemas Automáticos de Control de la Universidad de Piura; permitiendo de esta forma presentar los resultados previos de la investigación en el Congreso Latinoamericano de Control 2014 y participación en la escuela doctoral de automática en la Universidad Nacional del Litoral, Argentina.

Resumen

Los granos de cacao (*Theobroma cacao* L.) son el principal material para la producción de chocolate. La fermentación de los granos de cacao es esencial para remover la pulpa (mucílago) que envuelve a los granos y para el desarrollo de los precursores químicos del sabor del chocolate. La ecología microbiana de la fermentación de los granos de cacao es compleja e involucra el crecimiento secuencial de varias especies de levaduras, bacterias ácido lácticas (LAB), bacterias ácido acéticas y posiblemente algunos bacillus y bacterias formadoras de esporas. A pesar de más de 100 años de investigación de la ecología microbiana de esta fermentación, los roles de los diferentes grupos y especies en su contribución al proceso, calidad de grano y calidad del chocolate, aún no están completamente entendidos.

Debido a todos los estudios previos realizados en el campo de la fermentación del cacao, este trabajo plantea un modelo matemático generalizado para la fermentación del cacao, tomando como referencia el cacao de la variedad *Criollo Blanco* el cual en Latinoamérica ha presentado un valor de exportación elevado y alta demanda. Se propone un enfoque bioquímico donde se identifican los principales componentes y familias microbianas que aportan significativamente a las propiedades organolépticas de este producto.

Contenidos

“Desarrollo de un Modelo Matemático para la Fermentación del Cacao Criollo Blanco”.	1
Capítulo 1 Introducción: Análisis del Sector.....	11
1.1. Historia del cacao como un producto mundial.	12
1.2. El cacao en el Perú.....	13
1.3. Un Nuevo Enfoque en la industria del cacao nacional	13
1.3.1. Cadena logística en la exportación de cacao	16
1.3.2. Exportaciones de cacao en nuestro país.	17
1.3.3. Tumbes como productor de cacao.....	19
1.3.4. Piura, producción de calidad para el mundo.	20
Capítulo 2 Fermentación en Estado Sólido.	21
2.1. Comparación entre Fermentación en estado Sólido y Fermentación Sumergida.	22
2.2. Desventajas de la fermentación en medio sólido:.....	23
2.3. Influencia del pH en la fermentación de estado sólido.....	24
2.4. Influencia de la temperatura en la fermentación de estado sólido.	25
2.5. Aplicaciones de la fermentación en estado sólido.	25
2.5.1. Fermentación de estado sólido en la industria alimenticia.....	26
2.5.2. Fermentación de estado sólido en la industria farmacéutica.	26
2.5.3. Fermentación de estado sólido en la agroindustria.....	27
2.5.4. Fermentación de estado sólido en la desintoxicación biológica.....	27
2.5.5. Fermentación de estado sólido en el tratamiento de aguas residuales.....	27
2.6. Comercialización de la fermentación de estado sólido.....	27
Capítulo 3: Fermentación de Cacao.....	29
3.1. Principios de la fermentación del cacao.....	30
3.1.1. Rol de la fermentación en el cacao.....	30
3.1.2. Fermentación química y bioquímica.	31
Capítulo 4:	33
Modelo Matemático de un Biorreactor por Bandejas bajo un enfoque Bioquímico.	33
4.1. Ecuaciones Simplificadas de Reacciones Químicas	34
4.2. Valores de los microorganismos de la fermentación.	38
4.3. Modelo Batch de la Fermentación del Cacao.	38
4.4. Representación Matricial.	39
4.5. Modelo de fermentación expresado en ecuaciones diferenciales.	40

4.6.	Validación.....	41
4.7.	Modelo Dependiente de la Temperatura.....	46
4.8.	Cinética de Muerte Microbiana y Descomposición.....	46
4.9.	Modelo de calor y entalpías generadas en la biomasa de fermentación. 47	
4.10.	Balances másicos dentro del fermentador en cajas.....	48
4.11.	Balances energéticos dentro de la masa fermentativa.....	49
4.9.	Implementación del modelo en ECOSIMPRO.....	51
5.10.	Implementación del Modelo en Matlab usando S-Funcitons.	53
Capítulo 5: Resultados y Discusiones.		55
5.1.	Materiales y Métodos.....	56
5.2.	Plataforma de Adquisición de datos.	56
5.2.1.	Procesamiento de Señales.....	56
5.2.2.	Datos obtenidos por la plataforma de adquisición de datos.	60
5.3.	Respuesta del Modelo Matemático.....	61
Capítulo 6: Tendencias y Nuevas Líneas de Investigación Propuestas.....		69
6.1.	Estrategias de Control Aplicado a Biorreactores de Estado Sólido.....	69
6.2.	Observadores Asintóticos Aplicados a Bioprocesos.	71
Conclusiones.....		75
Bibliografía.....		77
Anexos.....		83
A2.1.	Principales reacciones químicas	86
A3.1.	Código del modelo matemático del biorreactor.....	91

Capítulo 1

Introducción: Análisis del Sector

El cacao, o *Theobroma cacao L.* es el principal ingrediente para la preparación de chocolate, pero este también es importante para la industria cosmética. Al contrario del uso generalizado de la palabra *cocoa* en inglés para tanto el árbol como el producto final (granos, polvo), algunos investigadores sugieren hacer la diferencia en ambas referencias. Bartley en el año 2005 (quién ha trabajado por más de 53 años en investigaciones referentes al cacao) sugiere que “cacao” hace referencia a la botánica, es decir a la planta o al árbol en sí, mientras que “cocoa” debe ser usado para los productos. Según su enfoque en la literatura inglesa se debería usar la palabra “cacao” como en español, pero ha sido diversificado por los distintos investigadores. Esto se puede observar en la base bibliográfica donde hacen distinción a ambos términos en diferentes trabajos referenciados.

La planta de cacao es un árbol perenne, esto quiere decir que, a diferencia de otros productos como el banano, el árbol florece cada año sin la germinación de “hijuelos” de la planta. Esta planta es originaria de los bosques húmedos de América central y Sudamérica, pero hoy ha sido plantada en más de 50 países con clima tropical entre las latitudes de 15S y 18N. En su mayoría la producción de cacao a nivel mundial es realizada por productores minifundistas (en promedio de 1 a 5 hectáreas), sin embargo, África es responsable del 72% de la producción a nivel mundial.

1.1. Historia del cacao como un producto mundial.

Muchos antes que el continente americano fuera descubierto, el cacao era usado por las civilizaciones mesoamericanas, particularmente por los “Olmecas” quienes vivían en la parte central de México y posteriormente por los Aztecas y Mayas. Investigaciones arqueológicas encontraron que el cacao fue parte de la dieta diaria y la cultura de las civilizaciones centro americanas desde 600 años A.C. tanto como bebida, como moneda de cambio. La bebida de chocolate era usada por la nobleza de estas civilizaciones quienes fermentaban el cacao en recipientes de piedra y mezclados con agua y especias locales. Los granos de cacao fueron usados por los conquistadores de los Aztecas, quienes pagaban impuestos al imperio, así como para el intercambio de bienes y esclavos. El cacao continuo hasta el día de hoy teniendo un gran impacto en muchos países, representando en gran cantidad el PBI de los países productores como Ghana, Indonesia y la Costa Ibérica.

Posteriormente a estos sucesos el cacao ingresó a Europa a través de España por uno de los monjes que participaba de la tripulación de la expedición de Hernán Cortés, el cual era enviado directamente a los monasterios donde por primera vez se desarrolló el producto que actualmente conocemos como chocolate.

Este suceso acompañado de la revolución industrial en Europa permitió que el proceso se tecnificara apoyándose de la invención de las primeras máquinas a vapor, cambiando el proceso artesanal de producción.

Como se mencionó anteriormente este proceso tecnificado ha permitido que la demanda de materia prima crezca exponencialmente y ha posicionado el consumo del chocolate sobretodo en Europa donde es parte de la dieta diaria, gracias al alto contenido en calorías que es requerido en tierras frías.

La figura 1 muestra como Costa de Marfil en el año 2013 mantenía la hegemonía de la producción seguido por Ghana. Ambos países en conjunto representan más del 50% de la producción mundial. A diferencia de estos países donde el volumen es superior a los países sudamericanos, en Brasil, Perú y Ecuador es reconocida la calidad del contenido de azúcares y polifenoles que son precursores en el aroma y la textura que posteriormente repercuten en la calidad del chocolate.



Figura 1 Producción de cacao por país y participación en el mercado 2013. (ICCO, 2014)

1.2. El cacao en el Perú.

Según el Ministerio de Agricultura (MINAGRI) del Perú, el cacao está teniendo un fuerte posicionamiento como producto de exportación, llegando a convertirse en uno de los principales productos exportados en los siguientes 5 años, y adicionalmente se prevé un crecimiento anual para el año 2016 del 15%, permitiendo consolidarse como uno de los mayores productores a nivel mundial. Este fenómeno se ha generado gracias a la reconversión de cultivos en zonas amazónicas donde era común la producción de coca, siendo este un programa de apoyo brindado por el estado. Adicionalmente gracias a la calidad del producto de nuestro país, han ingresado inversiones privadas para su producción, cultivando más de 15 mil hectáreas en el año 2014. En el año 2015 las ventas de cacao representaron 234 millones de dólares; cifra con la cual podemos suponer con el crecimiento esperado que se superarán las exportaciones de espárragos, mangos y uvas. Cabe resaltar que, con los cambios climáticos de este año, la producción de uva y espárragos en la costa del país se ha visto reducida (debido al retraso en la época de cosecha y sequías en el sur del país como resultado del Fenómeno “El Niño”)

En los últimos dos años se ha observado que el 60% de la producción se deriva a exportación y que solo el 40% es manejado en el mercado interno, siendo dentro de este volumen un 80% el denominado “descarte” de la producción, que generalmente es el que tiene problemas de fermentación y secado, generando una calidad inferior en el grano. Por ello se busca potenciar la industria nacional en productos derivados del cacao para de esta forma incrementar la exportación de chocolate nacional y disminuir la importación del mismo.



Fig 2 Selección del cacao según las características establecidas. Fuente: Grupo de Investigación en Fermentación de Cacao, UDEP, 2014.

1.3. Un Nuevo Enfoque en la industria del cacao nacional

En el año 2005 los chocolateros de la industria chocolatera europea volcaron su atención en el producto nacional, impulsando las actividades postcosecha del cacao, optando por incluir la fermentación del mismo y descubriendo su actualmente conocida calidad aromática y organoléptica, lo cual abrió la ventana comercial a mercados internacionales.

En la región norte del país se han establecido zonas cacaoteras logrando adaptación en inserción de cultivos de cacao en conjunto con productos como el banano, los cuales por condiciones climáticas similares necesarias para su desarrollo han tenido un fuerte

impacto en la economía minifundista de la zona. Estas zonas son: Chulucanas, Palo Blanco, Charanal, Platanal, Morropón, las zonas bajas de Bigote, Canchaque, Yamango, Santo Domingo, así como Montero, Paimas y hasta el distrito de Tambogrande.

Tabla 1 Extensión de cultivo en la zona de Piura. Fuente: ONG Progreso

Cultivos en la Región Piura	
Morropón	500 hectáreas
Huancabamba	400 hectáreas
Ayabaca	100 hectáreas
Total	1000 hectáreas

En la tabla 1 se puede mostrar un resumen de carácter macro de las zonas productoras, resumiendo en Morropón más de 500 hectáreas cultivadas de cacao (aún pequeñas en comparación a la zona amazónica del país), sumando un total de aproximadamente 1000 hectáreas.

El famoso chocolatero Stephane Bonnate, quién es el propietario de la marca de su mismo nombre y reconocido internacionalmente, llegó hace 5 años al norte del país donde personalmente reconoció las propiedades organolépticas del cacao de la región, destacando que este tiene hasta 10 aromas, 3 por encima de los cacaos oriundos de centro américa.

Además de la región norte del país, existen zonas de cultivo a lo largo del mismo, siendo las más representativas en volumen Tarapoto, Tingo Maria, y Apurimac en el sur. Esto se expresa en la figura 3 donde se presenta un mapa de la distribución de producción nacional.

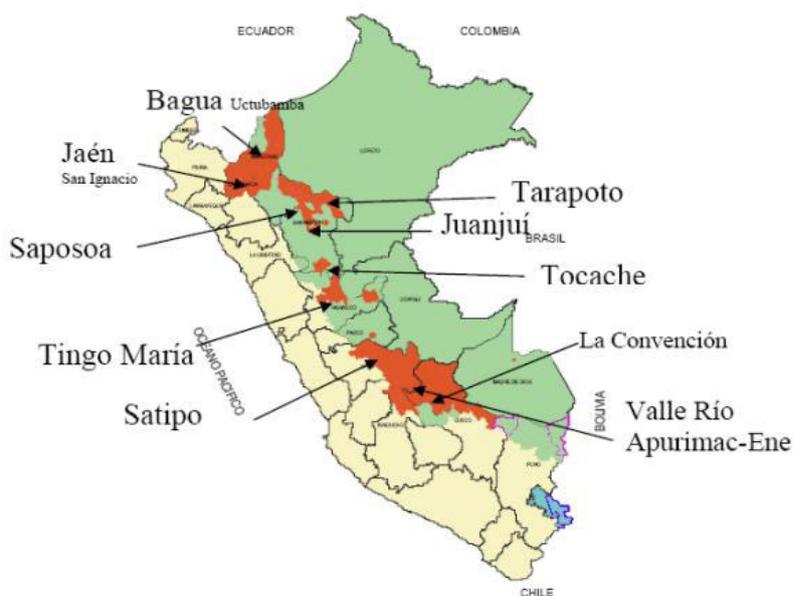


Fig 3 Mapa de producción de cacao en el Perú (MINAGRI).

Según lo mencionado anteriormente, el aporte al PBI de nuestro país en función de la exportación agrícola juega un rol importante y creciente en los últimos años, esto gracias a la industrialización de los productos. Esto se evidencia en el norte del país en distritos como Sullana y Tambogrande, donde existen más de 18 plantas de postproceso, empaque y exportación de productos agrícolas en general. En el año 2014 las exportaciones lograron un valor de más de 3500 millones de soles, el cual supera hasta en un 23% al monto del año anterior. Estas cifras si bien reflejan un escenario muy favorecido para la agricultura nacional, el cacao represente una porción menor en este universo, ya que solo el 3% de estas operaciones pertenecen el cacao

En el año 2011 las exportaciones de los productos derivados del cacao alcanzaron más de 100 millones de dólares, y aproximadamente 33 mil toneladas, siendo sus clientes finales los países de Estados Unidos, Europa y la Comunidad Andina.

En el mercado interno del país existen empresas ya consolidadas como las principales en la compra de cacao para elaboración de chocolate, siendo dos de estas “Theo Chocolate” y “Chocolate Valrhona”. Estas empresas en el Perú son parte de consorcios mayores cuyas sedes principales se encuentran en Japón, Alemania y Francia.

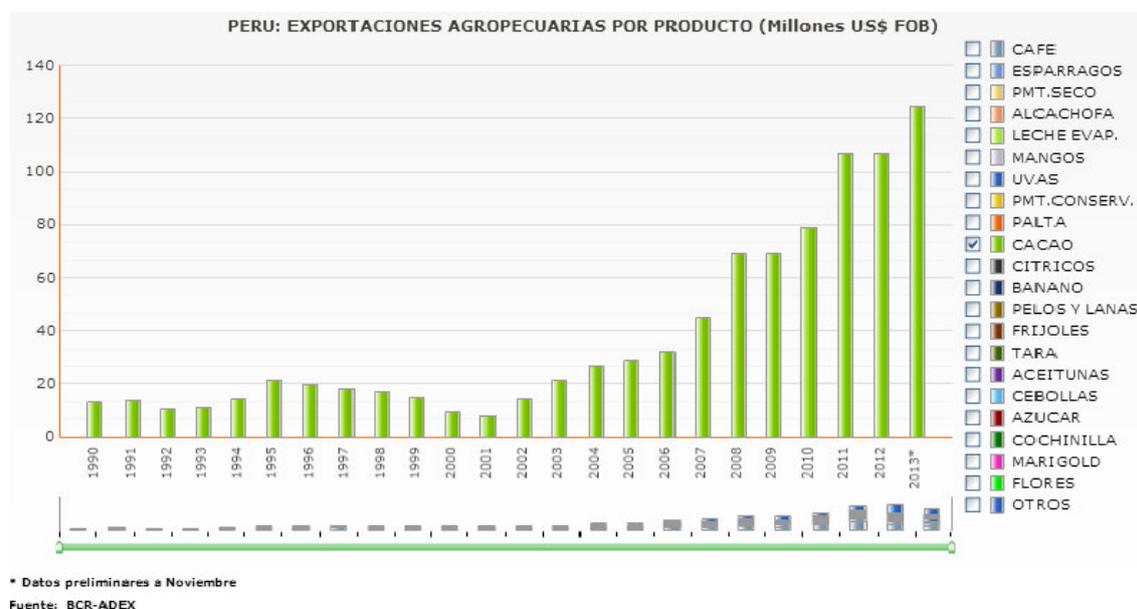


Fig 4 Gráfico de exportaciones agropecuarias en millones de dólares. (OGPA – MINAG)

1.3.1. Cadena logística en la exportación de cacao

La cadena productiva del cacao incluye a diversos actores hasta la exportación, lo cual ralentiza y crea barreras para la exportación directa por parte del sector productivo primario. En la figura 5 y 6 se puede observar un enfoque simplificado y detallado respectivamente de la cadena.

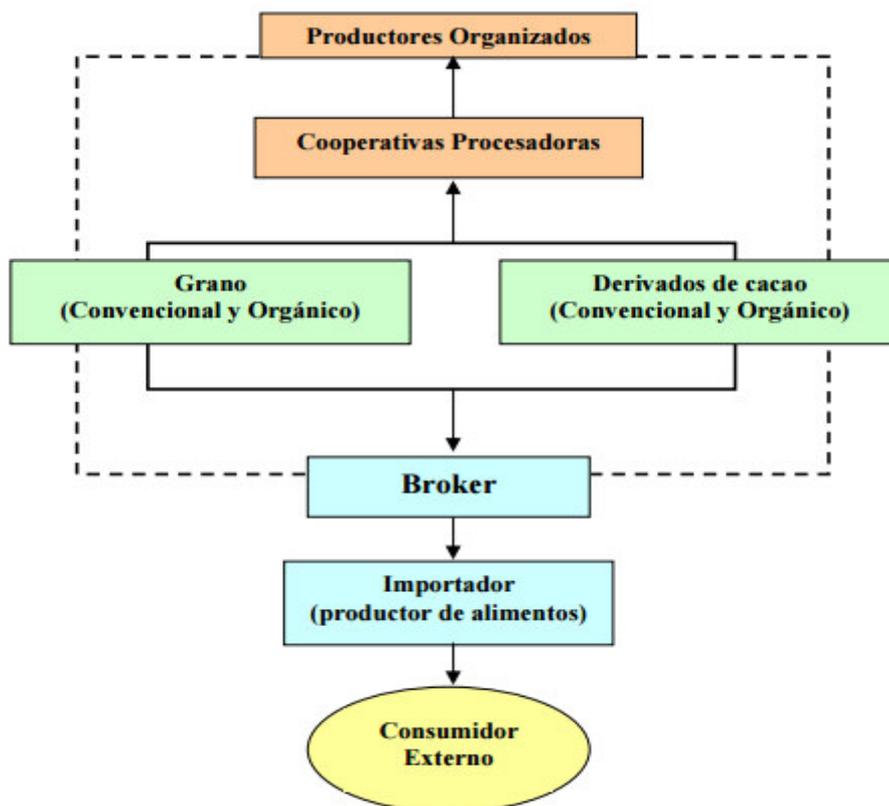


Fig 5 Cadena productiva de exportación simplificada. (MINCETUR 2014)

La cadena contiene un extenso contenido de actores hasta el consumir externo, siendo las cooperativas las encargadas de dirigir los procesos de calidad para derivarlo al bróker. Cabe resaltar que en la región existen solo dos cooperativas que actualmente están en la capacidad de poder respaldar financieramente estas operaciones, siendo ellas Cooperativa Agraria NORANDINO y la Asociación de Productores ASPROCAF (quien actualmente ya se constituyó como una cooperativa).

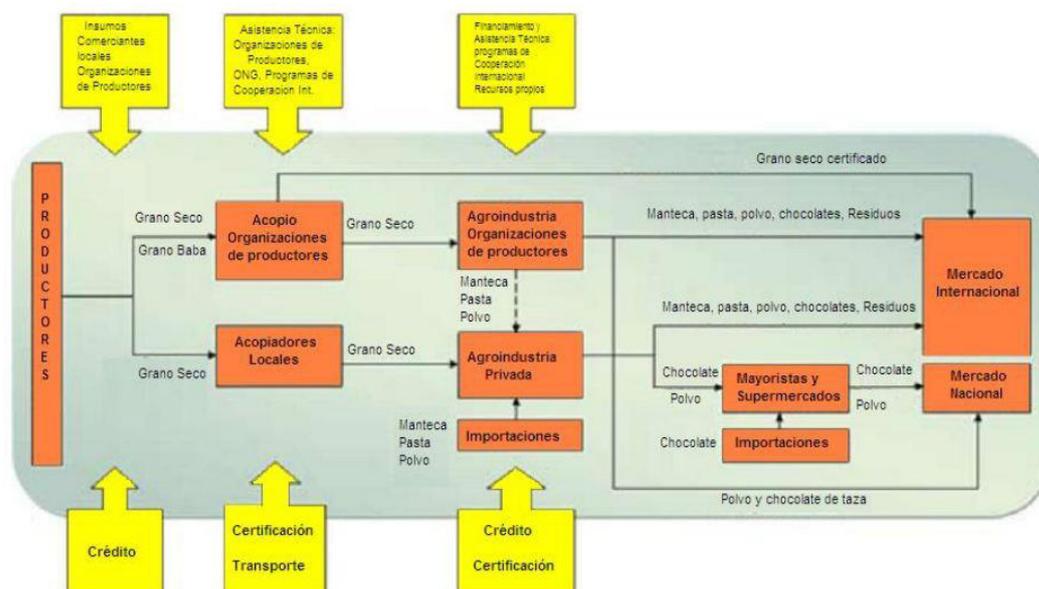


Fig 6 Esquema de cadena productiva de cacao en el Perú [29]

En la figura 6 se puede observar cómo existen limitantes crediticias que imposibilitan a actores primarios entrar de manera más participativa en la cadena, así como capacidad de almacenamiento, acopio y gestión de la calidad.

1.3.2. Exportaciones de cacao en nuestro país.

En los últimos meses se ha tenido un desbalance en el crecimiento expectante en el sector de agroexportaciones debido a que algunos productos han sufrido disminución en la producción como consecuencias de cambios climáticos en este año, como ausencia de las lluvias esperadas y sequías; siendo algunos de estos productos afectados, la uva y el espárrago, abriendo campo a la intensificación de otros cultivos como el cacao y los arándanos. Estas variaciones se han observado también en los últimos 5 años, por ejemplo, en enero del 2012 se alcanzó ventas de 0.89 millones frente a los 2.4 millones (precio FOB) del mismo período del 2011. En el mes de enero del 2012 se exportaron 337.45 toneladas métricas del cacao en grano, a un precio promedio de USD FOB 2.65 por kilo frente a USD FOB 3.25 por kilo en el mismo periodo del año 2011. [29]

Tabla 2: Exportaciones de cacao en grano, entero o partido - Enero 2012 [29]

EXPORTADOR	TOTAL FOB US \$	PESO NETO KG
AMAZONAS TRADING PERU S.A.C	359.146	149,462
SOCIEDAD ANÓNIMA CERRADA	109.824	49,920
ASOCIACIÓN DE PRODUCTORES "CACAO ALTO HUALLAGA"	102,710	37,761
IMPORTACIONES Y EXPORTACIONES AGRITUM E.	99,767	32,050
ASOCIACIÓN CENTRAL PIURANA DE CAFETALEROS-CEPICAFE	80,000	25,000

ECOANDINO S.A.C.	64,108	8,350
OPERADORES COMERCIALES Y LOGÍSTICOS LIMA	58,860	32,700
MACHU PICCHU FOODS S.A.C.	20,230	2,208
TOTAL	894,552	337,451

Las principales empresas que representan la exportación en modalidad de bróker en nuestro país son Amazonas Trading Perú S.A.C., abarcando el 40% del total exportado, alcanzando 149.4 toneladas métricas, seguidos por AGRITUM con 32 Toneladas métricas y finalmente ECOANDINO S.A.C.

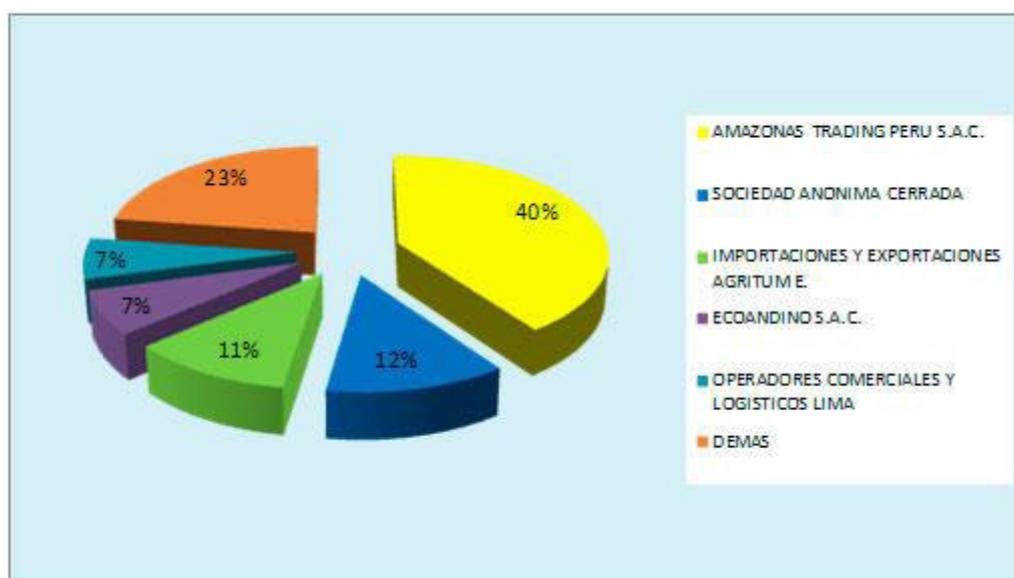


Fig 1 Principales empresas exportadoras de cacao en el Perú [29]

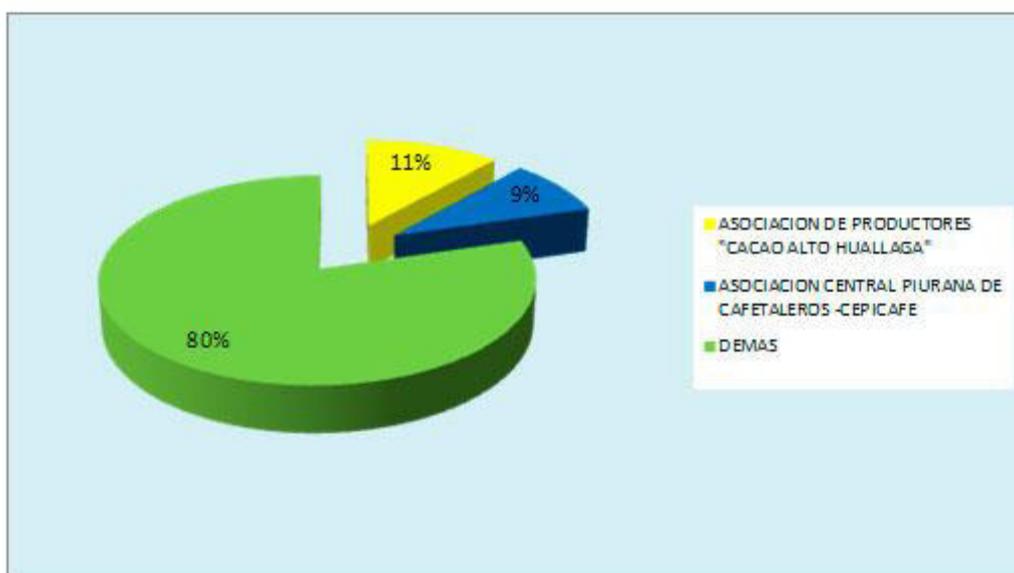


Fig 2 Principales organizaciones de productores exportadores de cacao en el Perú [29]

Las exportaciones también tienen una presencia marcada por diversos actores de la cadena comercial, siendo Italia y Bélgica quienes representan más del 60% de las operaciones según el informe de ADEX en el 2014. Existen otros países que tienen una presencia marcada como Holanda y Colombia, cuyas operaciones superan los 200 millones de dólares y finalmente podemos encontrar a Canadá y Estados Unidos, seguido de Alemania. [29]

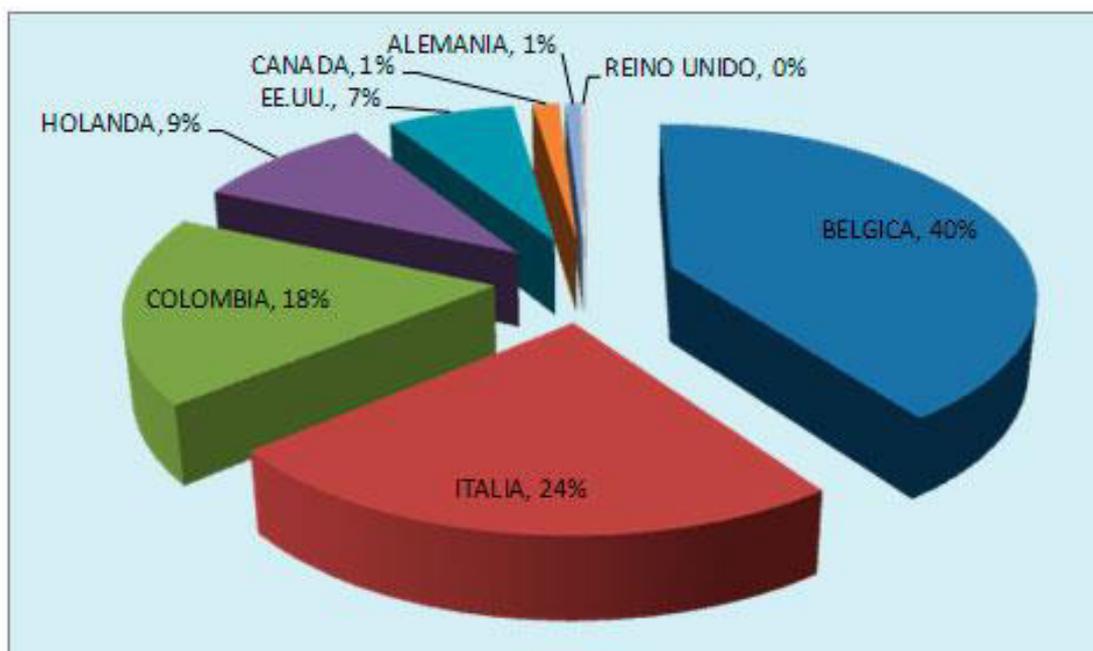


Fig 3 Principales países de destino de las exportaciones de cacao de grano [29]

1.3.3. Tumbes como productor de cacao.

En la región del norte del país. La producción agrícola en extensión es altamente dominada por regiones como Piura, pero la eficiencia de cultivo y el rendimiento por hectárea del mismo es dominada por Tumbes, donde las condiciones como clima, altura y suelo brindan un ecosistema más grato para las plantas. Las temperaturas son mayores en comparación a otras regiones del país, así como la humedad relativa, llegando en los veranos a más de 30 grados centígrados. Debido a que se encuentra cerca al margen ecuatorial tiene una humedad mayor al 72% las cuales varían según la temperatura. Además, como se mencionó anteriormente, gracias a la altura superior del piso de cultivo, esto genera microclimas más propicios.

Desde el año 2011, MINCETUR realizó el plan operativo del cacao en la región Tumbes, donde se promovieron estrategias para fortalecer la cadena productiva del cacao y de esta forma organizar al sector minifundista de la región el cual se encuentra mucho más atomizado que la región Piura.

Esta estrategia de crecimiento por parte de la región Tumbes ha sido exitosa, logrando una producción estimada de 45 mil toneladas para el año 2015, según el reporte del mismo año realizado por ADEX.

Hace 8 años, el ministerio de agricultura reportó que existen 270 hectáreas de cacao, las cuales representan el 0.54% del área del territorio nacional. De esta porción, 165 hectáreas se encuentran en producción con un rendimiento anual entre 900 a 1000 Kg/Ha el cual se encuentra por encima del promedio de nacional. Gran parte de la producción es destinado para el mercado nacional y una pequeña parte para el mercado de exportación. [53] [70]

Según Luis Mendoza, gerente de la asociación APPCACAO, en una entrevista al diario La República, el grano de cacao ha ingresado hace siete años fuertemente al mercado nacional y regional, ya que anteriormente se comercializaba manteca de cacao al mercado interno y posteriormente era exportado para mercados internacionales, en su mayoría Holanda y Estados Unidos.

1.3.4. Piura, producción de calidad para el mundo.

En el año 2014 se contabilizaron 1000 hectáreas cultivadas, lo cual representan una cantidad mucho menor en comparación con la región amazónica del país, las cuales tienen una producción aproximada de 300 toneladas métricas, de las cuales sólo el 40% se comercializa de manera orgánica para el mercado de exportación y en su mayoría la producción restante es calificada como cacao de descarte y comercializada para el mercado interno del país. Gracias a la cuenca productiva organizada por la Cooperativa NORANDINO, el resto de la producción se deriva al mercado nacional por pequeños intermediarios que lo derivan a Chiclayo y otras ciudades del país donde hay pequeñas plantas de producción.

Asociaciones productoras de cacao en la región de Piura:

- **ASPROBO:** Asociación de Productores de Banano y Cacao.
- **APPROCAP:** Asociación de Pequeños Productores de Cacao.
- **Asociación de Productores de Palo Blanco.**
- **Asociación de Productores de Puerta Pulache.**
- **ASPRAOSRA.**

Capítulo 2

Fermentación en Estado Sólido.

La fermentación en estado sólido o SSF en sus siglas, es acompañada inevitablemente por el desarrollo de concentraciones y gradientes de temperatura dentro de las partículas del sustrato y bioláminas (dependiendo del sustrato y el enfoque del modelo asociado). Estos gradientes son necesarios para dirigir el transporte de los sustratos y productos. Adicionalmente, los gradientes de concentración han sido estudiados y se ha concluido que juegan un rol crucial para obtener las características que definen los productos de la fermentación en estado sólido; sin embargo, los gradientes también son conocidos como el resultado de la productividad del proceso y de reacciones no deseadas durante la misma. La fermentación en estado sólido ha sido generalmente realizada en proceso tipo “batch” o por lotes y esto por ende complica su estudio y entendimiento debido a que las condiciones cambian en el tiempo y no puede hacerse un análisis en un estado de equilibrio, teniendo sobretodo un comportamiento transitorio durante su evolución. Los modelos matemáticos aplicados por ende son necesarios para mejorar el entendimiento de este proceso y permitir su manipulación para obtener los resultados deseados. Los modelos existentes son muy variados en este campo y se enfocan en los distintos fenómenos que se realizan durante el mismo. Como resultado de esta diversificación de enfoques los modelos actuales no pueden explicar la generación de numerosos productos que son formados durante la SSF y por lo tanto su resultado en términos de características del producto final. [48][49][58]

La fermentación en estado sólido o sustrato sólido ha sido usada por muchos años alrededor del mundo. Tradicionalmente la SSF había sido principalmente usada para la producción de alimentos fermentados de uso diario, como la soya. La SSF es definida como el crecimiento de microorganismos en un sustrato sólido con contenido de humedad

menor al 12%, en donde este valor permite mantener el crecimiento microbiano y su metabolismo, pero no existe movimiento libre de agua y aire.

Muchos tipos de microorganismo pueden ser aplicados en la fermentación de estado sólido para la producción de diversos productos, incluyendo bioactivos de alto valor. Los hongos, levaduras, algunas bacterias y combinación de ellas pueden ser usados en la SSF para asegurar su evolución. Productos como la glucoamilasa B y las esporas de hongos para biocontrol puede ser producidas solamente bajo SSF, dado que estas no pueden desarrollarse en proceso de fermentación sumergida. La tecnología SSF provee muchas nuevas oportunidades, así como permite el uso de productos agrícolas como sustrato de fermentación sin la necesidad de proceso de pre-tratamiento intensivo del mismo. Debido a que los productos de SSF no son altamente diluidos, estos pueden ser fácilmente recuperados de los productos de la fermentación, lo cual genera un valor adicional al proceso en cuanto a reutilización o derivación de productos residuales.

Al margen de todas las ventajas que posee la fermentación en estado sólido sobre la fermentación sumergida, la aplicación de SSF en procesos industriales ha tenido siempre dificultades en el monitoreo y el control de las diferentes variables involucradas en el proceso. Mientras que, en la fermentación sumergida, el medio puede ser considerado homogéneo, en SSF, existen muchos gradientes de temperatura y humedad que pueden generar un efecto negativo en la producción de metabolitos. Dentro de todas las variables involucradas, la temperatura es particularmente importante debido a que el crecimiento microbiano bajo condiciones aeróbica resulta en una liberación de calor, que puede producir disgregación de enzimas producidas y otros efectos que perjudican el crecimiento. También desde que la SSF ocurre en ausencia de agua libre, este calor excesivo es difícil de remover debido a la limitada conductividad térmica del sustrato sólido y la baja capacidad térmica del aire. Debido a esto, el mecanismo de evaporación ha sido considerado como uno de los más viables para el desarrollo del intercambio de calor a lo largo de los reactores de SSF. Sin embargo, se conoce que el enfriamiento evaporativo es acompañado de pérdidas de humedad que puede causar “secado” durante la fermentación, por lo tanto, para estos procesos es necesario monitorear tanto la temperatura como la humedad en simultáneo. Algunos estudios han usado mediciones indirectas (sensores virtuales o sensores de software) para monitorear el flujo, temperatura y humedad para controlar la temperatura y la humedad del agua en el medio de fermentación. Los perfiles de aireación con el monitoreo de oxígenos consumido y dióxido de carbono producido durante el metabolismo microbiano puede generar datos importantes relacionados a las variables de control.

2.1. Comparación entre Fermentación en estado Sólido y Fermentación Sumergida.

Muchos autores han discutido sobre las ventajas de la fermentación en estado sólido, mientras que otros han comparado algunas características de los productos que pson producidos por SSF sobre SmF (Fermentación Sumergida). Las mayores ventajas de la fermentación en estado sólido son:

- Se requieren pequeños volúmenes de masa fermentativo o volúmenes de los reactores, resultando en un menor costo de capital de operación.
- Menor probabilidad de contaminación debido a los bajos niveles de humedad.

- Fácil separación de los productos residuales debido a su baja dilución.
- Los coeficientes de rendimiento de producción son generalmente mayores.
- El oxígeno está por lo general libremente disponible en la superficie de las partículas.
- En el caso de fermentación de encimas no se tiene producción de residuos.
- Mayores fases de producción en la fermentación de amyloglucosidasa.
- Ausencia de co-productos carbohidratados.

2.2. Desventajas de la fermentación en medio sólido:

- Los microorganismos cultivados en este proceso se limitan a aquellos que existen con bajos niveles de humedad.
- La extracción del calor metabólico por lo general es realizada mediante la evaporación de los gases generados con alto contenido de agua, pero esto limita el escalamiento en reactores de acero inoxidable donde la transferencia de calor es elevada y lleva la temperatura del medio a valores demasiado bajos, así como la humedad.
- Debido al gradiente de temperatura generado a lo largo del reactor, se generan “puntos fríos” donde la proliferación de hongos y bacterias generadoras de esporas proliferan con mayor rapidez.
- No se puede aplicar instrumentación tradicional para el monitoreo de parámetros de control durante el proceso.
- El escalamiento conlleva dificultades no solo en dimensiones sino en el peso del reactor debido a que el sustrato presenta una densidad mucho mayor a los procesos de fermentación sumergida.
- Se dificulta la inocuidad o esterilización de bacterias que actúan durante la fermentación.

Generalmente cuando la fermentación es realizada en medios sólidos, el sustrato es heterogéneo debido a todas las razones fundamentadas en la introducción de este capítulo, y por lo tanto el sustrato es pobremente mezclado generando concentraciones no homogéneas de productos al finalizar la fermentación. De igual forma la humedad presente en el sustrato inicial dificulta el control del mismo, así como el monitoreo de parámetros como el pH, la temperatura y el oxígeno disuelto (comúnmente relacionado con la actividad y el crecimiento microbiano). Para poder llegar a parámetros óptimos y asegurar un producto final con los estándares mínimos, es necesario un proceso adicional de mezclado o agitación en el medio; sin embargo, este procedimiento puede dañar el micelio del sustrato, retardando el crecimiento y resultando en un crecimiento pobre de microorganismos.

En la implementación a escala industrial del proceso de fermentación en estado sólido se presentan diferentes dificultades, debido a que al ser en un proceso batch, no existen muchas variables que puedan ser controladas, los reactores SSF se encuentran fuertemente influenciados por condiciones ambientales como la humedad, pH, índice oxidación del agua, temperatura, disponibilidad del sustrato, disponibilidad de oxígeno libre, y el tamaño de las partículas. Para poder estudiar el proceso en escala piloto se han desarrollado biorreactores donde la transferencia de calor y masa es monitoreada, pero esto resulta sumamente costoso para su dimensionamiento comercial. Asimismo, la elevada densidad del sustrato dificulta la separación de la biomasa, y por tanto aumenta la energía necesaria por las enzimas para la producción de metabolitos.

Otra dificultad en el proceso es la relacionada con la separación de la biomasa, que es necesaria para realizar estudios acerca de la cinética bioquímica. Se han ideado métodos indirectos de estimación de concentraciones, estimación de DNA, cambios en el peso luego del secado, evolución de contenido de CO₂, pero aún no son del todo exactos. Se ha usado análisis por procesamiento de imágenes en un SSF, obtenidas por estereomicroscopios y cámaras digitales, pero éste también es un campo en actual desarrollo. [48]

Debido a la elevada complejidad de actores que interactúan en el proceso, la elaboración de modelos simplificados orientados al diseño y control de biorreactores ayuda a entender el proceso. Para obtener esto es necesario tener expresiones matemáticas con parámetros experimentales que se asemejen al comportamiento ampliamente no lineal de los procesos bioquímicos. Los modelos actuales para SSF, describen la conversión de los sustratos en producto de forma combinada, así como la interacción con la carga microbiana existente, así como su crecimiento y decaimiento (procesos comunes en biorreactores de tipo batch o lotes), sin embargo, comúnmente no explican la formación de productos durante y al finalizar el proceso. La modelación ha sido limitada por, como se dijo previamente, la dificultad de medir las concentraciones de microorganismos y compuestos, para así determinar la tasa de crecimiento de estos y hallar modelos cinéticos para la fermentación, adicionalmente se ha demostrado que la cinética es sensible a las variaciones a los gases generados en el ambiente, por lo que se puede estimar el cambio en las composiciones a partir de estos datos. Se puede concluir que el desarrollo de modelos en SSF se centra en: encontrar la representación de actividad microbiana y su patrón cinético, así como termodinámico.

2.3. Influencia del pH en la fermentación de estado sólido.

Así como la fermentación en estado sólido es fuertemente influenciada por las condiciones climáticas debido a que en su mayoría tienen que ser desarrollados en procesos batch, existen otros parámetros que no pueden ser controlados durante la evolución del mismo, y uno de ellos es el nivel de pH durante el proceso. Esta variable repercute directamente en la tasa de crecimiento microbiano debido a que existen un "pool" de bacterias en la etapa inicial y muchas de ellas pueden existir en ambientes de pH neutral, por lo tanto, si este nivel aumenta o disminuye la tasa de producción de productos de la fermentación se ve ralentizado. Adicionalmente a esta dificultad, la instrumentación aplicada para su monitoreo es generalmente aplicable en medios de fermentación líquida y por lo tanto debe extraerse muestras del proceso para ser mezcladas en concentraciones neutras para posteriormente dar un valor fuera de línea del pH.

El nivel de pH tiende a cambiar por diferentes razones; en el caso de la fermentación es debido a la generación de ácidos orgánicos como el ácido acético y el ácido láctico como resultado del metabolismo del sustrato con algunas bacterias y comúnmente se desarrolla en las etapas aeróbicas del proceso, por lo cual depende de igual forma de la cantidad de oxígeno libre en la zona circundante de las partículas o láminas de la biomasa. Para limitar estas variaciones se han utilizado sustratos adicionales que limitan y metabolizan la generación de los ácidos para disgregarlos en componentes secundarios que no afecten el pH y puedan ser fácilmente removidos en la etapa final de la fermentación. Un ejemplo de esto es que comúnmente se usa harina de yuca como sustrato y se añade sulfato de amonio para mantenerlo en niveles favorables.

2.4. Influencia de la temperatura en la fermentación de estado sólido.

En apartados anteriores hemos manifestado que existe una gran dependencia respecto a la temperatura del proceso, debido a que según los trabajos realizados por Arrhenius hace muchos años, la actividad microbiana tiene una dependencia parabólica alrededor de un punto óptimo de temperatura y este varía según las bacterias sean termofílicas (pueden resistir niveles altos de temperatura) o mesofílicas (su punto de crecimiento máximo se desarrolla alrededor de condiciones naturales de temperatura).

En el caso de un enfoque orientado a control de procesos, la temperatura es una variable importante de control y una de las pocas que pueden ser controladas mediante sistemas de intercambio de calor (también se expuso que los sistemas evaporativos son comúnmente usados en estas aplicaciones). Este parámetro es importante debido a la baja conductividad térmica del sustrato, así como la distribución heterogénea del sustrato, lo que favorece a que el calor metabólico se acumule en el sistema y por ende aumente la temperatura del cultivo.

Esta condición dentro de la biomasa fermentativa genera aspectos negativos durante el proceso, como por ejemplo la desaceleración de la tasa de crecimiento microbiano dada la relación de Arrhenius, deshidratación del medio sólido lo cual limita de igual forma la actividad microbiana y por ende la aceleración de los índices de muerte microbiana.

2.5. Aplicaciones de la fermentación en estado sólido.

La principal actividad de las bacterias en la naturaleza es producir enzimas hidrolíticas para poder romper los materiales residuales, residuos de plantas, vegetales y toda clase de residuos en compuestos minerales inorgánicos. Las bacterias extensamente hacen este trabajo, y para asegurar que no consuman todos los productos de la hidrólisis, muchas de ellas generan antibióticos.

Estas capacidades son la base de la producción de antibióticos y enzimas en la industria. En nuestros días los microorganismos son usados en muchas industrias de proceso para la producción de enzimas y otras moléculas, las cuales son usadas por las personas en sus actividades diarias. Por ejemplo, los detergentes ahora contienen enzimas que permiten que el proceso sea llevado a relativamente bajas temperaturas, y está demás hablar de imaginar una vida sin antibióticos.

En Oriente, la industria de la fermentación comúnmente cultiva hongos y otros microorganismos en nutrientes líquidos o fermentación sumergida, sin embargo, en Asia, los productos de la fermentación son realizados en medios sólidos. El crecimiento de los hongos benéficos es propicio en la fermentación de medio sólido debido a las condiciones

similares a su hábitat natural de desarrollo, como por ejemplo los materiales residuales, donde no todas las bacterias pueden subsistir. SSF ofrece un enorme potencial en la industria de la producción de enzimas, donde el desdoblamiento de las macromoléculas a moléculas más pequeñas permite que puedan ser posteriormente metabolizadas por otras bacterias para la generación de productos con alto valor farmacéutico.

La rotura de las cadenas de macromoléculas o conversión de moléculas usando enzimas es un campo de interés para diversas industrias. Estas enzimas brindan procesos de conversión muy específicos y naturales bajo las condiciones adecuadas, en contraste con la conversión química, que usualmente requiere procesos que generan productos no deseados y tóxicos. En adición a la producción de enzimas, SSF puede ser usado para la producción de una variedad de biomoléculas complicadas, las cuales son casi imposible de metabolizarlas químicamente. A continuación, se expondrán ejemplos de aplicación de la fermentación de estado sólido en diversas industrias.

2.5.1. Fermentación de estado sólido en la industria alimenticia.

La fermentación en estado sólido puede ser usada en la industria alimenticia para la producción de enzimas, ácidos orgánicos, compuestos aromáticos y otras sustancias de interés. Para la manufactura de salsa de soya, enzimas como las proteinasas son producidas industrialmente por la cultivación de *Aspergillus oryzae* en una mezcla de sustratos orgánicos. Estas proteinasas convierten la proteína insoluble de la soya en pequeños péptidos solubles y aminoácidos, que en conjunto conforman la salsa de soya.

El ácido cítrico es el compuesto orgánico más importante de la industria alimenticia y es actualmente producido en fermentación sumergida. Sin embargo, la fermentación de estado sólido tiene mucho potencial para la producción de ácido cítrico debido a que es más económico bajo el uso de sustratos basados en residuos industriales.

Las bacterias y los hongos permiten la síntesis de diferentes componentes aromáticos en la fermentación de estado sólido. Por ejemplo, el *Ceratocystis fimbriata* cultivado en fermentación de estado sólido sobre un sustrato a base de cascarrillas de café permite la obtención de un fuerte aroma a piña. De la misma forma aditivos alimenticios como las pirazinas, que generan saborizantes son producidos bajo fermentación de estado sólido con una cadena de bacterias de *Brevibacterium sp* sobre un sustrato de bagazo de caña de azúcar impregnado con un medio definido.

2.5.2. Fermentación de estado sólido en la industria farmacéutica.

Una nueva era en la terapia médica y la industria farmacéutica empezaron con el descubrimiento de los antibióticos. La penicilina y otros productos secundarios de hongos, actinomicetatos y bacterias han generado las herramientas más poderosas para combatir las infecciones de hongos y bacterias. Numerosas patentes describen el uso de la fermentación de estado sólido para la producción de nuevos antibióticos para combatir diferentes bacterias, como por ejemplo *Cryptococcus sp*, *Candida sp*, y *Streptomyces sp*. *Surfactin* es un antibiótico producido cultivando *Bacillus sp*. Bajo un medio de pulpa de soya, que es un residuo sólido de la producción de Tofu. La producción en SSF es de 4 a 5 veces más efectiva que la producción de SmF para estos antibióticos.

En el 2001, se aprobó una fábrica para la producción de lovastatin (una medicina usada para la reducción de colesterol) por la FDA. Las estatinas pertenecen a un grupo de

fármacos para la reducción de colesterol que previene los ataques cardíacos en pacientes con hipercolesterolemia.

2.5.3. Fermentación de estado sólido en la agroindustria.

Los biopesticidas actualmente usados para la prevención de hongos son una alternativa amigable al ambiente en comparación con los pesticidas químicos. En la literatura se describe una larga lista de hongos aplicados para la generación de este producto, por ejemplo, *Coniothyrium minitans*, el cual es un antagonista natural de los hongos *Sclerotinia sclerotiorum*, un patógeno en las patatas muy común que afecta a más de 360 especies. Estos pesticidas están comercialmente disponibles y son producidos mediante fermentación de estado sólido en sustratos de granos de cereales.

2.5.4. Fermentación de estado sólido en la desintoxicación biológica.

Algunos residuos agroindustriales contienen componentes tóxicos (tanto fisiológicos como nutricionales) como, cianuro de hidrógeno, cafeína, taninos, aflatoxinas, etc, lo cual genera dificultades en su utilización efectiva. Esto es un problema para las industrias de procesos, así como en los impactos ambientales. La fermentación en estado sólido ha sido recientemente aplicada para la desintoxicación de residuos como los cereales, las cáscaras de café, la pulpa de café, entre otros. Por ejemplo, las fermentaciones en estado sólido de las cáscaras de café han mostrado una reducción del 95% de cianuro de hidrógeno y una reducción de 42% en los niveles de taninos solubles.

2.5.5. Fermentación de estado sólido en el tratamiento de aguas residuales.

Actualmente se aplica la fermentación de estado sólido en las diversas áreas de la depuración de aguas residuales, las cuales incluyen, inspecciones críticas, tratamiento de aguas residuales domésticas y de municipios, aguas provenientes de procesos industriales, purificación de agua para consumo humano, entre otros. En estos procesos comúnmente se realiza la remoción de gases y tratamiento de lodos.

2.5.6. Fermentación de estado sólido en la purificación de aire contaminado.

En el campo de la purificación de aire contaminado se aplica el uso de microorganismos para consumir componentes químicos de una corriente de aire contaminado. Debido a las enzimas del sustrato, el aire se descompondrá, lo cual permite la separación de compuestos preferentemente orgánicos; sin embargo, se ha demostrado que algunas cepas pueden consumir algunos componentes inorgánicos, como es el caso del sulfuro de hidrógeno.

2.6. Comercialización de la fermentación de estado sólido.

En los recientes años, investigaciones en fermentación de estado sólido ha permitido el desarrollo de diferentes aplicaciones a escala piloto y estudios comparativos entre la fermentación en estado sólido y la fermentación sumergida han demostrado mayores rendimientos de productos realizados bajo SSF. Bajo el enfoque de los ejemplos anteriores, las aplicaciones comerciales de SSF en procesos en los países de Oriente se han visto ralentizadas, mientras que, en los países asiáticos, la SSF es mucho más común y las áreas de investigación en este campo apuntan directamente a la industrialización de alimentos.

fermentados como la salsa de soya, miso, natto (derivado de la soya), sufu y tempeh para poder cubrir la creciente demanda de estos productos gracias al amplio crecimiento demográfico. Todos estos productos son derivados de la soya y son generados en SSF en grandes biorreactores.

El principal problema en el escalamiento de reactores de SSF es remover el alto calor generado por la actividad metabólica de los microorganismos. Las absorciones del calor por conducción en camas estáticas están limitadas al bajo coeficiente de transferencia de calor y la ausencia de superficies de intercambio de calor de grandes dimensiones. El enfriamiento evaporativo ha probado ser más eficiente que la conducción y convección. Esta solución, aunque es funcional conlleva a grandes pérdidas de humedad y deshidratación del sustrato sólido. Sin embargo, es crucial el combinar el control de temperatura y humedad en los sistemas SSF de grandes dimensiones. El control del contenido de humedad es logrado por la adición de agua durante la fermentación. La adición de agua tiene mayores implicaciones de diseño en el biorreactor, ya que tiene que ser aplicada de forma homogénea en el sustrato sólido, lo cual requiere mecanismos de mezclado y agitación. El proceso de mezclado durante la SSF genera requerimientos adicionales para el sustrato sólido, por ejemplo, este proceso puede dañar los hongos cultivados lo cual reduce las tasas de crecimiento y producción. Este efecto puede depender de la escala del biorreactor y la forma de sus capas internas.

Capítulo 3: Fermentación de Cacao

Los granos de cacao (*Theobroma cacao* L.) son el principal material para la producción de chocolate. La Fermentación de los granos de cacao es esencial para remover la pulpa (mucilago) que envuelve a los granos y para el desarrollo de los precursores químicos del sabor del chocolate. ([4] [12]). La ecología microbiana de la Fermentación de los granos de cacao es compleja e involucra el crecimiento secuencial de varias especies de levaduras, bacterias ácido lácticas (LAB), bacterias ácido acéticas (AAB) y posiblemente algunos bacilos y bacterias formadoras de esporas. ([3] [6] [11]). A pesar de más de 100 años de investigación de la ecología microbiana de esta fermentación, los roles de los diferentes grupos y especies en su contribución al proceso, calidad de grano y calidad del chocolate, a 'un no están completamente entendidos.

La fermentación es generalmente practicada en tres formas, en cajas, montones y bandejas a través de 4 a 6 días de proceso. ([3], [5], [8], [2]; [10]). Empieza con el crecimiento de microorganismos cuyas actividades contribuyen a la degradación del mucilago alrededor del grano, y produce una variedad de productos metabólicos (alcoholes, ácidos orgánicos). Las principales fases de la fermentación de granos de cacao son fermentación alcohólica por las levaduras que convierten las azúcares existentes en la pulpa en etanol. La fermentación láctica, que produce ácido láctico a partir de las azúcares es principalmente realizada por bacterias ácido l' acticas (LAB) y tiene que ser evitada para obtener cacao de alta calidad. En la última fase de la fermentación, bacterias ácido acéticas (AAB) transforman alcohol en ácido acético ([2], [7], [11]).

Posteriormente a la fermentación, los granos de cacao son secados al sol, o artificialmente secados para reducir el contenido de humedad desde 60% hasta 7.5%. El proceso de secado debe llevarse a cabo cuidadosamente para asegurar que sabores no deseados

aparezcan. El secado debe llevarse de manera lenta; si los granos son secados rápidamente, algunas reacciones químicas iniciadas en la fermentación no serán completadas y el grano permanecerá ácido. Por otro lado, si el secado es muy lento puede aparecer moho en los granos, propiciando características desfavorables. ([4], [12])

Los microorganismos juegan un rol crucial en la calidad del cacao durante la fermentación ([7], [11]). La anuencia del origen del cacao y las prácticas de fermentación en el campo ha presentado una evolución y ha sido investigado extensivamente. Estos estudios han ayudado a entender el impacto de las prácticas de fermentación, sin embargo, aún poco es conocido sobre las comunidades microbianas, su dinámica y su rol en los procesos del cacao.

Debido a todos los estudios previos realizados en el campo de la fermentación del cacao, este trabajo plantea un modelo matemático generalizado para la fermentación del cacao, tomando como referencia el cacao de la variedad Criollo el cual en Latinoamérica ha presentado un valor de exportación elevado y alta demanda. Se propone un enfoque bioquímico donde se identifican los principales componentes y familias microbianas que aportan significativamente a las propiedades organolépticas de este producto.

3.1. Principios de la fermentación del cacao.

El origen de la fermentación de cacao se ha perdido con el tiempo, pero es generalmente asumido que inicialmente los primeros procesos de fermentación fueron realizados en “montones” para facilitar el efecto de remover la pulpa del mucílago circundante al grano y de igual forma facilitar posteriormente el proceso de secado. Los “jugos” segregados durante la fermentación son los que permiten que el producto final tenga una mejor apariencia y un valor agregado. Sin embargo, actualmente se coincide que el principal objetivo de la fermentación es el de matar el embrión de la semilla y poder desarrollar los sabores esenciales del chocolate. El principio detrás de la fermentación involucra el mantener la masa de cacao bien aislada para que el calor pueda ser retenido, mientras al mismo tiempo se permite el paso de aire a través de la masa. Teóricamente, las condiciones de fermentación ideal son en una fina capa de granos de cacao, donde en su mayoría estos puedan ser aireados y el aire puede penetrar rápidamente, elevar rápidamente la temperatura y eliminar complementamente el embrión. El proceso de fermentación es usualmente manejado mediante el aroma y los cambios del color externo del grano, usando estos parámetros como indicador del final de la fermentación.

3.1.1. Rol de la fermentación en el cacao.

Los granos crudos de cacao son excesivamente amargos debido a la presencia de las metil-xantinas como la teobromina y la cafeína en el cotiledón. Estos mismo también son astringentes debido a la presencia de polifenoles y taninos, en su mayoría flavonoides y antocianinas. Debido esto los granos en su estado natural no pueden ser usados para la producción de chocolate porque cuando son procesados, no desarrollarían las características de sabor. La fermentación, sin embargo, induce ciertas transformaciones bioquímicas dentro del cotiledón, lo que lidera la formación de color, aroma y precursores del sabor a chocolate. Algunos de los polifenoles amargos y astringentes se difunden a través del grano y son oxidados por las oxidasas polifenoles para producir taninos insolubles. Posteriormente la pérdida del sabor amargo y astringencia es desarrollada durante la etapa subsecuente de secado y también durante el tostado de los granos de cacao. Cuando

los granos de cacao seco fermentado son tostados, los precursores del sabor son transformados en compuestos que caracterizan el típico sabor asociado con el chocolate. La fermentación también ayuda a remover la pulpa del mucílago alrededor de los granos de cacao, y esto hace posible que los granos puedan ser secados y almacenados.

3.1.2. Fermentación química y bioquímica.

Los granos de coca consisten de dos cotiledones o semillas, cada uno con un embrión radicular, rodeado por una membrana llamada testa, y esta es envuelta por azúcares, de textura mucilaginosa llamado pulpa. La pulpa corresponde aproximadamente al 40% del peso del grano crudo y su contenido es entre 10% a 15% azúcares, principalmente glucosa, fructuosa y sacarosa. Las pulpas sin madurar de las mazorcas de cacao contienen gran cantidad de sacarosa, mientras que las mazorcas maduras contienen principalmente fructuosa y glucosa. La pulpa también contiene pequeñas cantidades de proteínas, aminoácidos, minerales y vitaminas, principalmente vitamina C, así como entre 0.5% y 2% de ácido cítrico el cual causa que el nivel de pH reduzca hasta 3.3 o 4. En adición, la pulpa contiene alrededor de 2% de pectinas y otros polisacáridos que lo hacen viscoso. [62] [63] [64].

Los granos de cacao en sí mismos contienen aproximadamente entre 32% y 39% de agua, 30% y 39% de grasas, 8% a 10% de proteínas, 2% a 3% de celulosa, 4% a 6% de almidón, 4% a 6% de pentosas, 2% a 3% de sacarosa, 5% a 6% de polifenoles, 1% de ácidos, 1% a 3% de teobromina y 0.2% a 1% de cafeína. [62]

Los granos de cacao forastero sin fermentar tienen un color violeta debido a la presencia de antocianinas en el cotiledón, El cacao criollo contiene aproximadamente las dos terceras partes de poli fenoles en comparación al forastero, pero no posee tantas atocianinas. Las antocianinas son por lo general inestables y su color es afectado por el pH. Estas son de color rojo a valores de pH bajos y se van oscureciendo al acercarse al valor de pH 5, y se vuelven violeta en los valores de pH entre 6 y 7. En los valores de 7 y 8 estos se tornan de un color azul oscuro y con valores mayores de pH pueden ser de un color amarillento. El cambio en la coloración de las antocianinas puede no solo deberse el cambio del nivel de pH, sino también puede ser causado por la formación de un complejo débil con otras moléculas de antocianinas o por hidrólisis. [64] [65]

La fermentación de cacao es un proceso espontáneo, que empieza inmediatamente después que los granos son removidos de la mazorca. Dos eventos importantes ocurren en este instante: el primero involucra la acción microbiana en la pulpa del mucílago, y resulta en la producción de alcohol y ácidos, así como generación de calor. Esta fermentación en la pulpa incluye la acción de las levaduras, bacterias ácido lácticas y bacterias acéticas, sin embargo, las especies *fungi* y *bacillus* también se encuentran en esta fase inicial. La pulpa es hidrolizada y degradada por estos microorganismos, y resulta en la producción de un líquido con alto contenido en azúcares, comúnmente llamado “sudores” de la fermentación. No toda la pulpa es necesaria para una fermentación satisfactoria y ha sido sugerido que hasta el 20% de la pulpa puede ser removido sin afectar la fermentación. Esa pulpa puede ser usado para la manufactura de otros productos con valor agregado. [68] [67]

El segundo suceso en la fermentación de cacao ocurre como consecuencia combinada del incremento de temperatura y la penetración de alcohol y ácidos, que son producidos en la pulpa dentro del grano. Estas condiciones matan la semilla y causan la ruptura de las celdas de almacenamiento en el cotiledón y un incremento en la permeabilidad de la célula. Los componentes celulares de las semillas ahora pueden mezclarse libremente y el resultado bioquímico lidera la producción de los precursores del sabor a chocolate. Estas reacciones incluyen el desdoblamiento de las proteínas en péptidos y aminoácidos, y la conversión de sacarosa en glucosa y fructuosa. Los contenidos de teobromina y cafeína se reducen ligeramente debido a la difusión a través de los granos. Las antocianinas, que generan la coloración violeta, rápidamente se desdoblan en antocianidinas, y los polifenoles en conjunto se oxidan y polimerizan los taninos. Ellos también se difunden fuera de los granos llevando a un decrecimiento en el contenido de polifenoles. [63] [64] [65]

En la fermentación de cacao forastero, el color de los granos cambia de blanco a un color ligeramente marrón luego de 60 horas de fermentación, oscureciendo posteriormente el color entre las 72 y 84 horas. Luego de las 144 horas, el color es oscuro marrón-rojizo y se sigue oscureciendo durante el secado. Al comienzo de la fermentación, el olor de la masa de cacao es húmedo y frutal, pero luego de las primeras 24 horas este cambia hasta un olor más alcohólico. Luego de 36 a 48 horas, se genera un olor avinagrado debido al contenido de ácido acético generado por la oxidación del alcohol, y este desaparece luego de 60 y 72 horas. El olor acético continúa hasta incrementar la intensidad posteriormente a las 120 horas y finalmente luego de 144 horas aún mantiene estas características, salvo que la temperatura descienda y no se pueda metabolizar todo el etanol. Si la fermentación se prolonga aún más, el olor gradualmente se convierte en húmedo y se proliferan hongos. [68]

Capítulo 4:

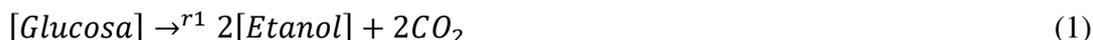
Modelo Matemático de un Biorreactor por Bandejas bajo un enfoque Bioquímico.

En el capítulo anterior se describió los procesos que se desarrollan durante la fermentación, los cuales incluyen el metabolismo de muchos compuestos y el desarrollo de reacciones bioquímicas predominantes. Por ello se ha implementado un modelo simplificado identificando las reacciones predominantes durante la fermentación y aquellos que son precursores de las características más resaltantes del aroma y sabor en el cacao. Para esto se han realizado las siguientes consideraciones de modelamiento:

- El desdoblamiento de sacarosa en glucosa y fructuosa se realiza en la etapa de “aguante” que se genera entre el corte de las mazorcas y el inicio de la fermentación. Proceso que usualmente dura 24 horas en la mayoría de centros de acopio productivo.
- Se ha identificado cepas de microorganismos predominantes en la variedad “Criollo Blanco” y se ha trabajado en función a estas.
- No existe intercambio másico en la cabecera de los cajones de fermentación ni cambios de fase predominantes.
- El intercambio de calor se da en el lecho de la biomasa y con las paredes de los cajones de fermentación.

4.1. Ecuaciones Simplificadas de Reacciones Químicas

Se plantea un modelo simplificado de las reacciones de la fermentación del cacao en base a la descripción extendida de las reacciones que se encuentran en el anexo 2 de este trabajo. [69]



Proceso de Glucólisis que se desarrolla en todo proceso de fermentación. Se ha detectado que la levadura que se encuentra en este proceso es la *S. Cerevisae*, caracterizada para cacao blanco. R1 es la velocidad de la reacción.



Estas reacciones son debido a la participación de bacterias lácticas. Para el cacao blanco el microorganismo encontrado es la *L. Plantarum*. La concentración de ácido láctico es quién regula principalmente el nivel de pH, pero en exceso deteriora el sabor del cacao.



Finalmente, esta reacción es debido a la presencia de bacterias acéticas, y para el caso del cacao blanco se ha encontrado que esto se debe a la presencia del microorganismo *A. Pasterianus*. Esta reacción es la responsable del aumento de temperatura en el proceso de fermentación debido a que es exotérmica.

Las familias de microorganismos para levaduras, bacterias lácticas y bacterias acéticas nombradas se han identificado en función a las siguientes investigaciones:

Tabla 3 Levaduras predominantes. Fuente: Elaboración propia

País	Referencia	Método	Cultivo	Levaduras Predominantes
Ghana	Jaspersen et al. (2005), Nielse et al. (2007)	Montones (100-500 kg)	Forastero	Saccharomyces cerevisiae Candida krusei Pichia membranifaciens.
Ghana	Jaspersen et al. (2005), Nielse et al. (2007)	Cajas (100 kg)	Forastero	Saccharomyces cerevisiae. Pichia membranifaciens. Hansiaspora Guilliermondii.
Costa Ivory	Papalexandratou and Luc De Vuyst (2011)	Cajas y Montones (cantidad no referenciada)	Cultivo no referenciado	Hansiaspora sp. Pichia kudriavzevii Saccharomyces cerevisiae
Indonesia	Ardhana y Fleet (2003)	Cajas (1000 kg)	Trinitario / Forastero	Candida tropicalis Saccharomyces cerevisiae Kloeckera apis
Brazil	Illegghems et al. (2012)	Cajas (1500 kg)	Criollo / Forastero	Hansiaspora uvarum H. opuntiae Saccharomyces cerevisiae
Brazil	Pereira et al. (2012)	Cajas (40-1000 kg)	Híbridos Mixtos	Saccharomyces cerevisiae.

Tabla 4 Bacterías Lácticas predominantes. Fuente: Elaboración propia

País	Referencia	Método	Cultivo	B. Lácticas Predominantes
Ghana	Nielse et al (1979)	Montones (500 kg) Cajas (2500 kg)	Forastero	Lactobacillus Fermenten Lactobacillus Plantarum
Brasil	Papalexandrotou (2011)	Cajas (1200 kg)	Criollo	Lactobacillus nagelli Lactobacillus fermentun
Brasil	Illegghems et al (2012)	Cajas (1500 kg)	Criollo	Lactobacillus plantorum
Brasil	Pereira et al (2012)	Cajas (40 - 1000 kg)	Híbridos	Lactobacillus Plantarum Lactobacillus Fermentum
Ecuador	Papalexandrotou (2011)	Cajas (100 kg)	Nacional / Trinitario	Lactobacillus Plantarum Lactobacillus Fermentum Leuconostoc pseudomesentoroides
República Dominicana	Lagnes – Gálvez (2007)	Cajas (100 kg)	Trinitario	Lactobacillus Plantarum L Brevis

Tabla 5 Bacterias Acéticas predominantes. Fuente: Elaboración propia

País	Referencia	Método	Cultivo	B. Acéticas Predominantes
Ghana	Nielse et al (2007)	Montones (500 kg) Cajas (2500 kg)	Forastero	Acetobacter Pasterianus Acetobacter sizienzii Acetobacter Tropicalis
Brasil	Papalexandrotou (2011)	Cajas (1500 kg)	Criollo	Acetobacter Pasterianus
Brasil	Illegheims et al (2012)	Cajas (1500 kg)	Criollo	Acetobacter Pasterianus Gluconacetobacter oxydans
Brasil	Pereira et al (2012)	Contenedor plástico (500 kg)	Híbridos	Acetobacter tropicalis
Ecuador	Papalexandrotou (2011)	Cajas (100 kg)	Nacional / Trinitario	Acetobacter Pasterianus
República Dominicana	Lagnes – Gálvez (2007)	Cajas (100 kg)	Trinitario	Acetobacter lovanensis

4.2. Valores de los microorganismos de la fermentación.

En el trabajo [29] se encontró mediante pruebas experimentales que la tasa máxima de crecimiento de la levadura *S. Cerevisae* en condiciones óptimas de crecimiento oscila entre 0.42 h^{-1} y 0.5 h^{-1} . Esta hipótesis es válida dado que las variaciones de pH durante la fermentación no son significativas y oscila entre los valores óptimos.

Para las bacterias lácticas se encontró el valor de la tasa de crecimiento máxima entre 0.34 h^{-1} y 0.37 h^{-1} , según los experimentos realizados en [30]. Para el caso de bacterias acéticas se encontró un valor máximo de tasa de crecimiento de 0.1 h^{-1} según los trabajos realizados por S. Salgueiro en [31].

4.3. Modelo Batch de la Fermentación del Cacao.

Definiremos la siguiente nomenclatura.

$$\begin{aligned} [\textit{Glucosa}] &\rightarrow S_1 \\ [\textit{Fructuosa}] &\rightarrow S_2 \\ [\textit{Ac. Láctico}] &\rightarrow S_3 \\ [\textit{Ac. Acético}] &\rightarrow P_1 \\ [\textit{S. Cerevissae}] &\rightarrow X_1 \\ [\textit{L. Plantarum}] &\rightarrow X_2 \\ [\textit{A. Pasteriuanus}] &\rightarrow X_3 \end{aligned}$$

Usando un modelo de balance másico general aplicado para bioprocesos reescribiremos las relaciones estequeométricas incluyendo la concentración de las bacterias procedentes de la fermentación, siendo X las variables de estado correspondientes a los microorganismos.

$$k_1 S_1 \rightarrow^{r^1} k_2 S_3 + X_1 \quad (5)$$

$$k_3 S_2 \rightarrow^{r^2} t_1 P_1 + k_4 S_3 + X_2 \quad (6)$$

$$k_5 S_1 \rightarrow^{r^3} t_1 P_1 + X_2 \quad (7)$$

$$k_6 S_3 \rightarrow^{r^4} t_3 P_2 + X_3 \quad (8)$$

En esta nueva expresión de las ecuaciones las constantes k son los coeficientes estequeometricos que acompañan a los sustratos, los coeficientes t son los coeficientes estequeometricos que acompañan a los productos y las constantes r son las velocidades de reacción.

Aplicando ecuaciones de conversación de la masa considerando un volumen V constante

$$S_1(t + dt) = S_1(t) - k_1 r_1(.) V dt - k_5 r_3(.) V dt \quad (9)$$

$$\frac{S_1(t+dt) - S_1(t)}{dt} = -k_1 r_1(.) V - k_5 r_3(.) V \quad (10)$$

Ahora tomaremos que todas las concentraciones son volumétricas y que la velocidad de reacción ahora depende de la concentración de bacterias presentes en la biomasa.

$$\frac{dS_1}{dt} = -k_1 r_1 - k_5 r_3 \quad (11)$$

Aplicaremos el mismo balance másicos para los dos sustratos restantes.

$$\frac{dS_2}{dt} = -k_3 r_2 \quad (12)$$

$$\frac{dS_3}{dt} = r_1 k_2 + r_2 k_4 - r_4 k_6 \quad (13)$$

La misma formulación aplicada para los productos de la fermentación resulta en el siguiente modelo:

$$\frac{dP_1}{dt} = r_2 t_1 + r_3 t_2 \quad (14)$$

$$\frac{dP_2}{dt} = t_3 r_4 \quad (15)$$

Finalmente, el desarrollo de los microorganismos está directamente relacionado con la velocidad de la reacción química lo cual la convierte en una ecuación recursiva.

$$\frac{dX_1}{dt} = r_1 = \mu_{1max} \frac{S_1}{k_{S1} + S_1} X_1 \quad (16)$$

$$\frac{dX_3}{dt} = r_4 = \mu_{4max} \frac{S_3}{k_{S4} + S_3} X_3 \quad (17)$$

$$\frac{dX_2}{dt} = r_2 + r_3 = \mu_{23max} \left(\frac{2S_2}{k_{S2} + S_2} + \frac{S_1}{k_{S3} + S_1} \right) X_2 \quad (18)$$

4.4. Representación Matricial.

Los bioprocesos comúnmente se representan en forma matricial bajo la siguiente forma.

$$\dot{\varepsilon} = kr(\cdot) + D(\varepsilon_{out} - \varepsilon) - Q(\varepsilon) \quad (19)$$

“D” corresponde al “Dilution Rate” que es la relación de la concentración del flujo de entrada respecto al volumen total de la biomasa. En este caso como es un sistema batch, el segundo término se reduce a cero. Adicionalmente estamos considerando que la fase gaseosa no coexiste con la biomasa debido a que los componentes volátiles se disipan el cabeza del fermentador.

Epsilon corresponde al vector de estados del proceso así que será de la siguiente forma.

$$\varepsilon = \begin{bmatrix} S_1 \\ S_2 \\ S_3 \\ P_1 \\ P_2 \\ X_1 \\ X_2 \\ X_3 \end{bmatrix} \quad (20)$$

Según las relaciones estequiométricas el sistema quedará representado por los “yield coefficients” los cuales definen la relación de consumo y producción de sustratos y productos con respecto a cada microorganismo y está definido para cada familia.

Los Yield Coefficient determinan la razón de consumo de sustratos para la producción de biomasa. Me permite conocer cuánto de sustrato se requiere para la proliferación microbiana de cada especie.

$$Y_{X/S} = Nmoles * \frac{masa sustrato}{masa microbiana} \quad (21)$$

Por lo general se hayan experimentalmente y a través de ellos caracterizo la relación con los productos y demás sustratos. Permiten describir mi modelo con mayor exactitud. Para nuestro modelo se usaron los coeficientes hallados en los trabajos [32] [33] [34].

- $y_{A.Pasterianus/ Etanol} = 0,16$
- $y_{A.Ace'tico/A.Pasterianus} = 9,8$
- $y_{A.Láctico/L.Plantarum} = 3,33$
- $y_{Glucosa/L.Plantarum} = 3,33$
- $y_{Metanol/L.Plantarum} = 0,593$
- $y_{Fructuosa/L.Plantarum} = 3,33$
- $y_{Glucosa/S.Cerevisae} = 1,9608$
- $y_{Etanol/S.Cerevisae} = 1,0027$

$$\dot{\varepsilon} = \begin{bmatrix} \dot{S}_1 \\ \dot{S}_2 \\ \dot{S}_3 \\ \dot{P}_1 \\ \dot{P}_2 \\ \dot{X}_1 \\ \dot{X}_2 \\ \dot{X}_3 \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} 0,1324 & 7,55 & 1,3 & 9,8 \\ 3,33 & 3,33 & 0,3 & 0 \\ 10 & 0,1667 & 0,555 & 0,3704 \\ 0,593 & 0,2557 & 0,8523 & 1,667 \\ 1,9608 & 0,5114 & 1,0027 & 0,51 \\ 1 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 1 & 1 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 1 \end{bmatrix} \begin{bmatrix} r_1 \\ r_2 \\ r_3 \\ r_4 \end{bmatrix} \quad (22)$$

$$y = [0 \quad 0 \quad 0 \quad 1 \quad 1 \quad 0 \quad 0 \quad 0] \varepsilon \quad (23)$$

$$r_1 = 0.42 \frac{S_1}{k_{S_1} + S_1} X_1 \quad (24)$$

$$r_2 = 0.34 \frac{S_2}{k_{S_2} + S_2} X_2 \quad (25)$$

$$r_3 = 0.34 \frac{S_1}{k_{S_3} + S_1} X_2 \quad (26)$$

$$r_4 = 0.1 \frac{S_3}{k_{S_4} + S_3} X_3 \quad (27)$$

4.5. Modelo de fermentación expresado en ecuaciones diferenciales.

De la forma matricial anterior podemos expresar el modelo de fermentación de cacao criollo en 8 ecuaciones diferenciales de la siguiente forma:

$$\frac{dS_1}{dt} = -0.42 \frac{S_1}{kS_1+S_1} X_1 - 0.34 \frac{S_1}{kS_3+S_1} X_2 \quad (28)$$

$$\frac{dS_2}{dt} = -0.34 \frac{S_1}{kS_1+S_1} X_2 \quad (29)$$

$$\frac{dS_3}{dt} = 0.84 \frac{S_1}{kS_1+S_1} X_1 + 0.34 \frac{S_2}{kS_2+S_2} X_2 - 0.1 \frac{S_3}{kS_4+S_3} X_3 \quad (30)$$

$$\frac{dP_1}{dt} = 0.34 \left(\frac{S_2}{kS_2+S_2} + \frac{2S_1}{kS_3+S_1} \right) X_2 \quad (31)$$

$$\frac{dP_2}{dt} = 0.1 \frac{S_3}{kS_3+S_3} X_3 \quad (32)$$

$$\frac{dX_1}{dt} = 0.42 \frac{S_1}{kS_1+S_1} X_1 \quad (33)$$

$$\frac{dX_2}{dt} = 0.34 \left(\frac{S_2}{kS_2+S_2} + \frac{S_1}{kS_3+S_1} \right) X_2 \quad (34)$$

$$\frac{dX_3}{dt} = 0.1 \frac{S_3}{kS_4+S_3} X_3 \quad (35)$$

4.6. Validación.

Para el proceso de validación se ha tomado como base los estudios realizados por Rosane Schwan en [32] donde se caracterizó los componentes químicos y la población microbiana durante la fermentación en cajas de madera y en un biorreactor de acero inoxidable.

A continuación en la siguiente tabla se muestran los datos usados para la validación luego de transformar las unidades formadoras de colonias a concentración volumétrica usando los datos realizados por Neidhart en [33] para calcular la masa promedio de las bacterias que se encuentran en nuestro proceso.

Para *S. Cerevisiae* se usará 5 picogramos como masa de una unidad formadora de colonia en masa seca, y para las demás bacterias se usará 0.95 picogramos según los trabajos de Neidhart et al. Los datos tomados son la suma de las concentraciones encontradas en el contileción y en el mucílago, ya que los estudios realizados comúnmente separan ambas partes para realizar las pruebas, pero para nuestro modelo estamos evaluando la evolución del proceso como una sola biomasa. La frecuencia de muestreo para el experimento realizado por la Dra. Rossane Scwhan fue cada 12 horas, abarcando todo el proceso de fermentación.

Tabla 6 Datos promediados para la validación del modelo

Glucosa	Fructuosa	Etanol	A.Lactico	A.Acetico	S.Cerevisae	L.Plantarum	A.Pasterianus
142,4	162,5	0	0	0	5,51	6,13	5,6
51,5	26,8	65,5	15,4	0	7,57	8,06	6,2
26	56	26,2	14,55	15	6,42	8,45	6
40,4	45,3	29,1	15,6	14	5,13	8,45	5,9

20,3	40,2	34	18,1	22	5,97	8,56	5,7
4,8	40	25,8	13,05	22,2	5,04	8,45	4,6
6	43	12,6	10,6	27,9	0,5	7	5
5,4	60	33,5	9,5	30,2	0,5	6,8	3,3
31	54	19,2	7,1	30	3,77	7,1	3,5
24	44	21,2	7,6	30,9	4,09	6,8	3,4
17,8	33	18,3	8,05	33	5,04	7,8	3
17,5	34,5	15,2	7,5	34,2	4,79	7,2	3,5
17,3	32,3	13,2	7,4	36,1	4,68	8	3,5

Se ha implementado en Matlab un programa para el ajuste de los parámetros K_s del modelo, los cuales representan la constante de media velocidad, que es el valor que tiene la concentración cuando la tasa de crecimiento está a la mitad.

Los resultados obtenidos fueron los siguientes:

$$ks_1 = 0.000154612$$

$$ks_2 = 0.343493$$

$$ks_3 = 2.28715$$

$$ks_4 = 1.5$$

Se implementó un modelo no lineal tipo “gray-box” donde se especificaron las unidades de las variables estimadas del modelo, así como las salidas. Al ser un proceso batch las ocho variables se han usado como variables observables.

Los resultados de la simulación en Matlab se aprecian en la siguiente figura:

```

Discrete-time nonlinear grey-box model defined by 'fermentation_model' (MATLAB file):

x(t+Ts) = F(t, u(t), x(t), p1, ..., p4)
y(t) = H(t, x(t), p1, ..., p4) + e(t)

with 8 states, 8 outputs, and 4 free parameters (out of 4).

States:
initial value
x(1) Glucosa(t) [mg/g] xinit@expl 142.4 (fix) in [0, 200]
x(2) Fructuosa(t) [mg/g] xinit@expl 162.5 (fix) in [0, 200]
x(3) Etanol(t) [mg/g] xinit@expl 0 (fix) in [0, 200]
x(4) A. Lactico(t) [mg/g] xinit@expl 0 (fix) in [0, 200]
x(5) A. Acetico(t) [mg/g] xinit@expl 0 (fix) in [0, 200]
x(6) S. Cerevisae(t) [mg/g] xinit@expl 0.00161797 (fix) in [0, 200]
x(7) L. Plantarum(t) [mg/g] xinit@expl 0.00128151 (fix) in [0, 200]
x(8) A. Pasterianus(t) [mg/g] xinit@expl 0.000378202 (fix) in [0, 200]

Outputs:
y(1) y1(t) [mg/g]
y(2) y2(t) [mg/g]
y(3) y3(t) [mg/g]
y(4) y4(t) [mg/g]
y(5) y5(t) [mg/g]
y(6) y6(t) [mg/g]
y(7) y7(t) [mg/g]
y(8) y8(t) [mg/g]

Parameters:
value
p1 p1 0.000154612 (est) in [0, Inf]
p2 p2 0.343493 (est) in [0, Inf]
p3 p3 2.28715 (est) in [0, Inf]
p4 p4 1.5 (est) in [0, Inf]

```

Figura 6 Resultado del Toolbox de Optimización de Parámetros para Modelos Caja Gris

En la figura 39 se muestra el resultado obtenido por el modelo directo, usando el modelo de crecimiento microbiano de “Monod” donde se ve una excesiva concentración de Ácido Láctico, por lo cual se ha planteado implementar un modelo “Haldane” con una constante de inhibición en la tasa de crecimiento quedando de la siguiente forma:

$$\frac{dX_3}{dt} = 0.1 \frac{S_3}{kS_4 + S_3 + \frac{S_3^2}{ki}} X_3 \quad (36)$$

Esta nueva constante de inhibición formula que en “exceso” de sustrato, la bacteria láctica no se desarrollará apropiadamente y ralentizará su crecimiento hasta que se controle la cantidad de sustrato disponible en la biomasa. Usando nuevamente el toolbox de Matlab para identificación de modelos de caja gris se ha obtenido un valor de “*ki*” igual a 23.52 obtenido los resultados de la figura 40.

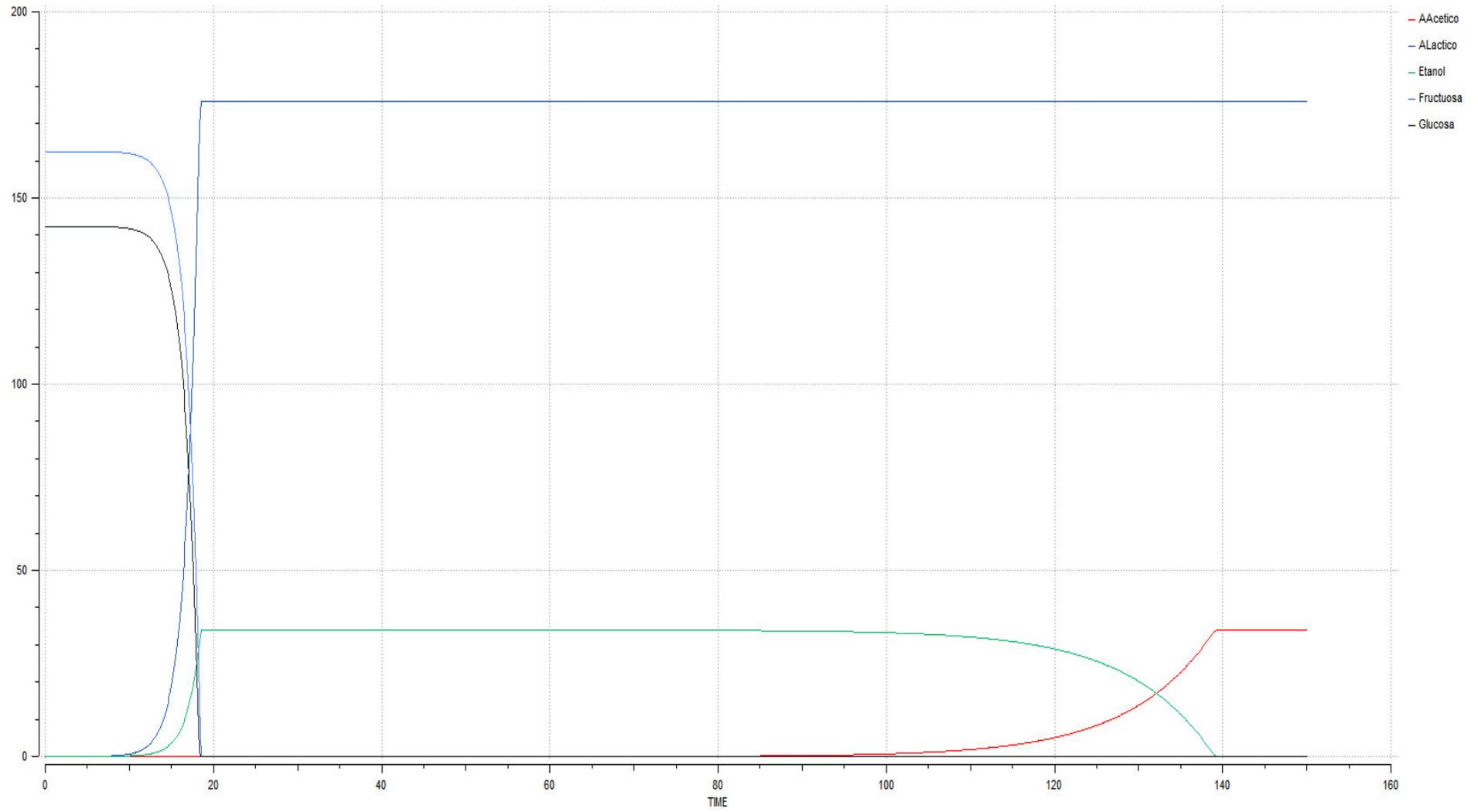


Fig 7 Resultados del modelo de fermentación usando la tasa de crecimiento de Monod

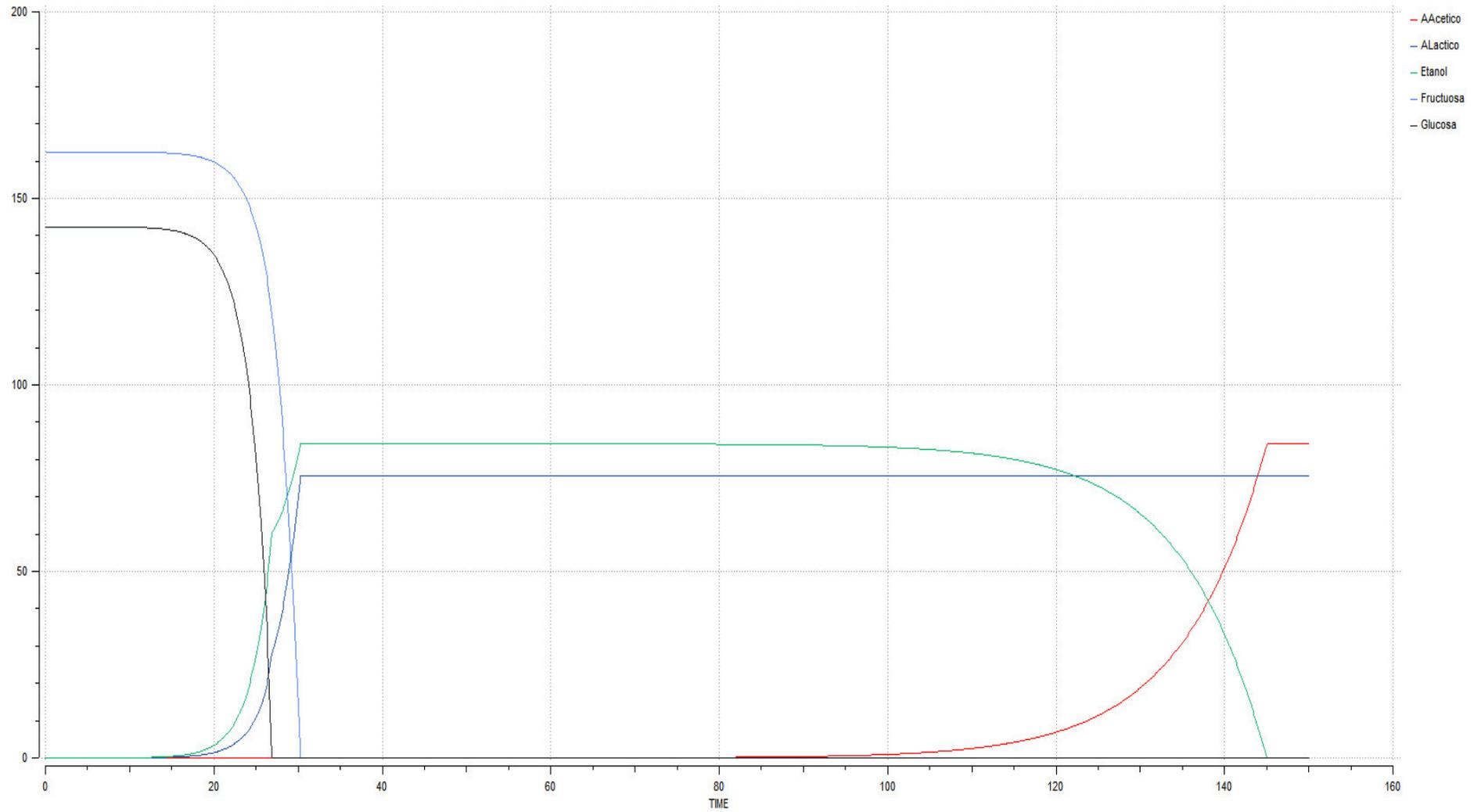


Fig 8 Resultado del modelo de fermentación usando la ecuación "Haldane" para la tasa de crecimiento de bacterias lácticas

4.7. Modelo Dependiente de la Temperatura.

Se usaron diferentes trabajos científicos para determinar la influencia de la temperatura en cada especie microbiana identificada. F. Noé encontró en [35] que las levaduras dependían del contenido de azúcar en el sustrato, la temperatura y el pH. Para este trabajo se aproximó esta dependencia de la siguiente forma:

$$u_{max_{s.cerevisiae}} = -0,003 * Ts^2 + 0,034 * Ts - 0,4103 \quad (37)$$

La bacteria láctica *L. Plantarum* presenta una dependencia fuerte de la presencia de oxígeno y comportamiento diferentes para proceso aeróbicos y anaeróbicos. Estos resultados mostraron también comportamiento dependiente de la temperatura, presentando diferentes tasas de crecimiento máximo en 20, 30 y 40 grados centígrados. [36]

$$u_{max_{l.plantarum}} = -0,0071 * Ts^2 + 0,5368 * Ts - 9,5086 \quad (38)$$

Finalmente D. A. Ratkowsky [37] encontró la influencia directa de la temperatura con la tasa de crecimiento para diferentes bacterias, incluyendo a la *A. Pasterianus*.

$$u_{max_{a.pasterianus}} = -0,0014 * Ts^2 + 0,0996 * Ts - 1,5739 \quad (39)$$

Con este nuevo enfoque las tasas de reacción de las reacciones químicas también dependerán de la temperatura y se verá una influencia directa entre la temperatura y la evolución de la fermentación.

4.8. Cinética de Muerte Microbiana y Descomposición.

Los microorganismos poseen una dinámica de crecimiento limitada por la cantidad de sustrato disponible, y en función a ello se modela un componente llamado “Cinética de Muerte Microbiana” que se puede cuantificar como una relación proporcional a la concentración de microorganismos. De esta forma podemos modelar la tasa de crecimiento de las tres familias de bacterias que hemos encontrado para la fermentación del cacao de la siguiente forma:

$$s.cerevisiae = r1 - coef.muertemicrob_{s.cerevisiae} * s.cerevisiae \quad (40)$$

$$l.plantarum = 2 * r2 + r3 - coef.muertemicrob_{l.plantarum} * l.plantarum \quad (41)$$

$$a.pasterianus = r4 - coef.muertemicrob_{a.pasterianus} * a.pasterianus \quad (42)$$

Los parámetros de ajuste del modelo no lineal ahora también serán los coeficientes de muerte microbiana o “Death Rate” los cuales se hallarán usando datos experimentales.

- $coef.muertemicrob_{s.cerevisiae} = 0,005$
- $coef.muertemicrob_{l.plantarum} = 0,01$
- $coef.muertemicrob_{a.pasterianus} = 0,03$

Al igual que la cinética de muerte de los microorganismos, donde la concentración de bacterias disminuye en proporción a su aumento; existe un comportamiento similar para la descomposición de algunos compuestos químicos. En la fermentación del cacao este fenómeno se da en el ácido láctico y en el etanol. Ambos productos presentan una fase de descomposición proporcional a la concentración.

4.9. Modelo de calor y entalpías generadas en la biomasa de fermentación.

Dentro de las consideraciones del modelo se han aplicado conceptos de cinética química para poder relacionar la entalpía de reacción de la forma: $aA + bB \rightarrow cC + dD$ en base al trabajo realizado en la Universidad de Piura. [69]

$$\Delta H_{R_x}(T) = \frac{d}{a} H_D(T) + \frac{c}{a} H_C(T) - \frac{b}{a} H_B(T) - H_A(T) \quad (43)$$

Las entalpías de reacción dependen de la temperatura de la masa fermentativa ya que se asume para el modelo una distribución homogénea. Para poder calcular los valores se evalúa la expresión en función de la temperatura.

$$H_i = H^o(T_R) + \int_{T_R}^T C_{P_i} dT \quad (44)$$

El primer término es la entalpía de formación a una temperatura de 25 grados centígrados y el segundo término es en función de la capacidad calorífica, la cual se puede encontrar en tablas. [69]

En función a esto se puede simplificar la expresión de la siguiente forma:

$$\Delta H_{R_x}(T) = \left[\frac{d}{a} H^o_D(T_R) + \frac{c}{a} H^o_C(T_R) - \frac{b}{a} H^o_B(T_R) - H^o_A(T_R) \right] + \left[\frac{d}{a} C_{P_D} + \frac{c}{a} C_{P_C} - \frac{b}{a} C_{P_B} - C_{P_A} \right] (T - T_R)$$

Según lo valores de las tablas que se encuentran en el anexo 2 la expresión anterior queda de la siguiente forma:

$$H_1(T_b) = [-31.1 * 10^3 + (T_b - 25)(362.62)] / 342.2965 * [sacarosa] * M * r_1$$

$$H_2(T_b) = [-70.7 * 10^3 + (T_b - 25)(79.84)] / 180.1559 * [glucosa] * M * r_2$$

$$H_4(T_b) = [-122.503 * 10^3 + (T_b - 25)(-122.93)] / 180.1559 * [fructosa] * M * r_4$$

$$H_5(T_b) = [-74.81 * 10^3 + (T_b - 25)(58.11)] / 180.1559 * [fructosa] * M * r_5$$

$$H_6(T_b) = [-434.21 * 10^3 + (T_b - 25)(387.07)] / 192.124 * [citrico] * M * r_6$$

$$H_7(T_b) = [-492.5 * 10^3 + (T_b - 25)(56.9)] / 46.06844 * [etanol] * M * r_7$$

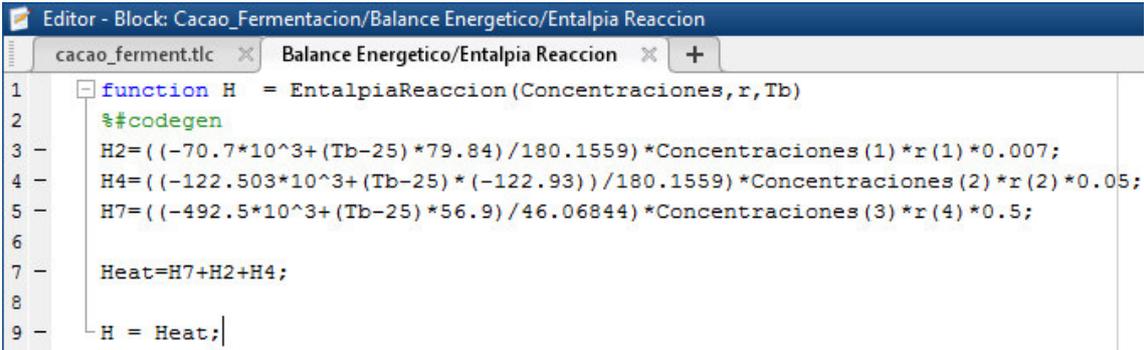
$$H_9(T_b) = [-4.09 * 10^3 + (T_b - 25)(-15.27)] / 98.08 * [lactosa] * M * r_9$$

$$H(T_b) = H_1(T_b) + H_2(T_b) + H_4(T_b) + H_5(T_b) + H_7(T_b) + H_9(T_b)$$

(45)

Las unidades de las ecuaciones son Joule/segundo, siendo M la masa total de la masa fermentativa. Debido a que se asume que no hay intercambio másico predominante entre la cabecera y el lecho, este se asume constante. Finalmente, los valores de “r” responden a la velocidad de reacción química, los cuales para modelos bioquímicos se asume que son iguales a la tasa de crecimiento de la bacteria predominante en cada reacción.

Estas ecuaciones han sido simplificadas debido al bajo aporte de algunas reacciones en función a sus bajos calores específicos y sus bajas concentraciones en comparación de componentes predominantes como el etanol. Por ello se ha implementado un bloque de código dentro del modelo en Simulink, donde el calor final generado corresponde a la suma de las entalpías predominantes.



```

Editor - Block: Cacao_Fermentacion/Balance Energetico/Entalpia Reaccion
cacao_ferment.tlc Balance Energetico/Entalpia Reaccion
1 function H = EntalpiaReaccion(Concentraciones, r, Tb)
2 %#codegen
3 H2=((-70.7*10^3+(Tb-25)*79.84)/180.1559)*Concentraciones(1)*r(1)*0.007;
4 H4=(-122.503*10^3+(Tb-25)*(-122.93))/180.1559)*Concentraciones(2)*r(2)*0.05;
5 H7=(-492.5*10^3+(Tb-25)*56.9)/46.06844)*Concentraciones(3)*r(4)*0.5;
6
7 Heat=H7+H2+H4;
8
9 H = Heat;

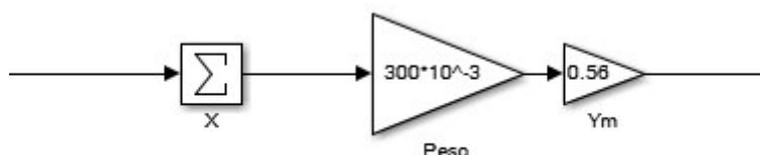
```

Fig 9. Código del bloque de Entalpia de Reacción

Como puede observarse se han mantenido las entalpías H2, H4 y H7 que corresponden a la conversión de azúcares en etanol por el proceso de glucólisis y a la producción de ácido acético a partir del etanol, siendo esta última la reacción predominante en la generación de calor durante la fermentación.

4.10. Balances másicos dentro del fermentador en cajas.

El balance de masa dentro del lecho fermentativo se calcula en función de la masa de los diferentes compuestos químicos, siendo el resultado una sumatoria de las concentraciones, multiplicados por la masa inicial y finalmente por un factor en función del contenido de sólidos secos.



Esto corresponde a la integral de la siguiente expresión.

$$\frac{dM}{dt} = Y_m \frac{dX}{dt} \quad (46)$$

El valor de Ym ha sido calculado mediante simulaciones y usando el toolbox de optimización de parámetros en modelos no lineales de Matlab, siendo finalmente el valor igual a 0.56 y estando en el rango brindado por bibliografías similares (entre 0.4 y 0.6).

4.11. Balances energéticos dentro de la masa fermentativa.

Tomando en consideración que el proceso de vaporización del agua dentro de la masa fermentativa demanda transferencia de calor, así como el calor generado por las entalpías de reacción generadas en la masa fermentativa se realiza un balance considerando los siguientes valores:

- Capacidad calorífica del agua líquida: $4184 \text{ J.kg}^{-1} .\text{°C}^{-1}$
- Capacidad calorífica de la materia seca: $1000 \text{ J.kg}^{-1} .\text{°C}^{-1}$
- Entalpia de vaporización del agua: $2.414 \cdot 10^6 \text{ J.kg.agua}^{-1}$
- Se asume el calor producido por el metabolismo del sustrato proporcional a la variación de la biomasa (ecuación 46).

Bajo estas consideraciones la ecuación de balance energético en el lecho queda de la siguiente forma:

$$\frac{d[T_b M(C_{pm} + C_{pw}W)]}{dt} = H_T(T_b) - K_w(T_{amb} - T) \quad (47)$$

Se está asumiendo que no existen intercambios de calor entre la biomasa y las paredes del fermentador debido a que ambos se encuentran a la misma temperatura. Las pérdidas de calor consideradas en el modelo son debido a transferencia de calor con el ambiente a través de las paredes del fermentador, siendo K_w la inversa de la resistencia equivalente por conducción según la geometría del cajón fermentador. Se monitorea en tiempo real la temperatura ambiente que es una variable de entrada al proceso y T es la temperatura calculada iterativamente por el modelo, correspondiente a la biomasa fermentativa.

Esto ha sido implementado en la plataforma simulink y se muestra en la siguiente figura.

.

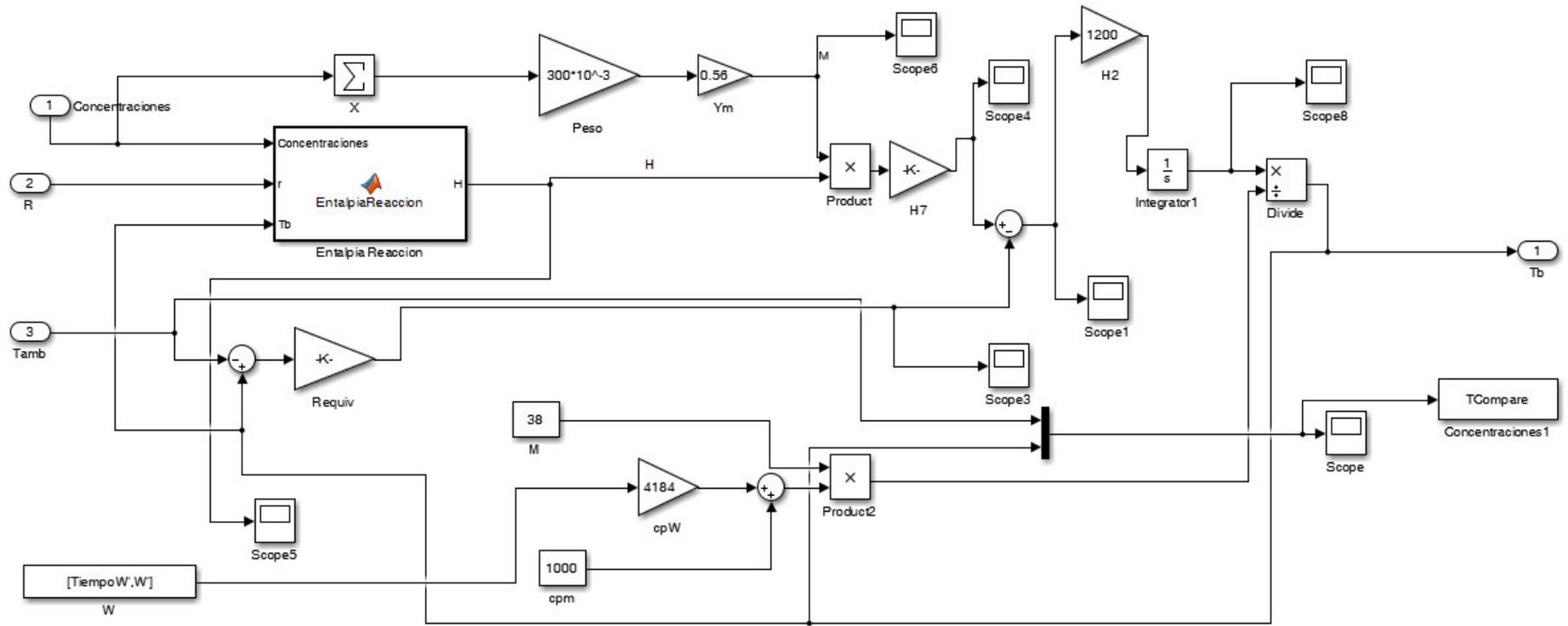


Fig 10 Modelo de Balance Energético en Simulink

4.9. Implementación del modelo en ECOSIMPRO.

Para la plataforma ECOSIMPRO solo se ha modelado el comportamiento de las concentraciones tanto de componentes químicos como de actividad microbiana y el código del programa se puede observar en los anexos de este trabajo, así como los experimentos y consideraciones usadas en la simulación de los siguientes resultados. Cabe resaltar que estos resultados son netamente teóricos en cuanto a la influencia de la temperatura e intercambios de masa pertinentes durante el proceso debido a la complejidad de incluir ecuaciones altamente no lineales en esta plataforma de simulación. Posteriormente en el siguiente capítulo se muestran resultados de la simulación usando datos reales de temperatura ambiente y humedad de la masa fermentativa.

Esto ha sido implementado en el bloque “Balance Energético” que se mostrará en el apartado final de este capítulo como parte de todo el modelo final.

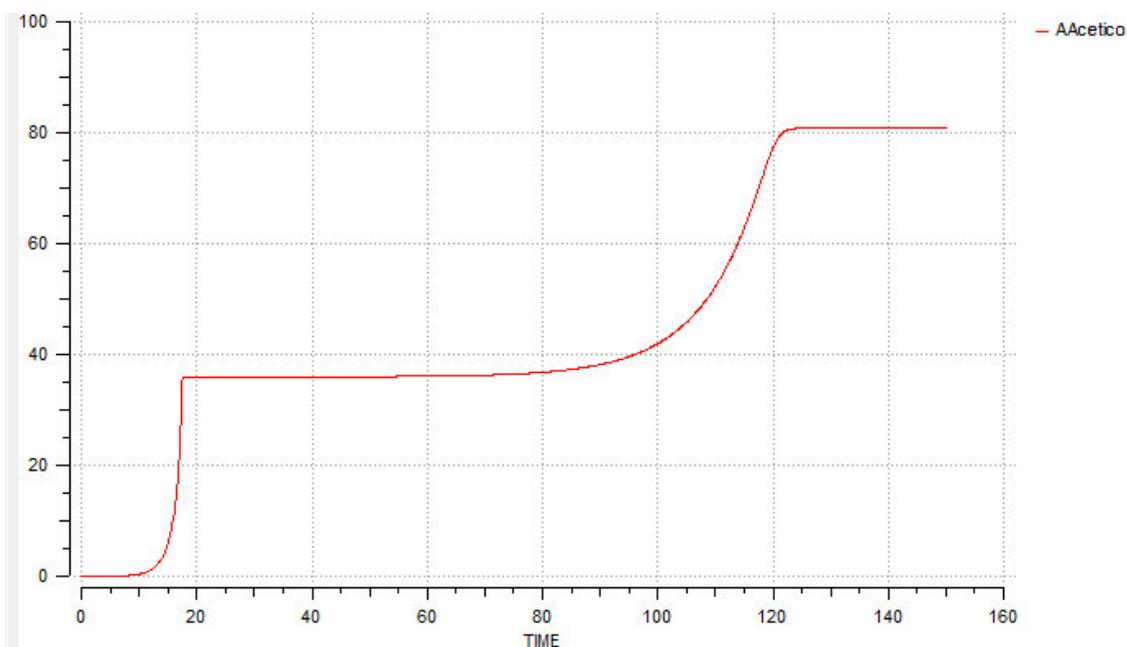


Fig. 11. Simulación en ECOSIMPRO del contenido de ácido acético durante la fermentación

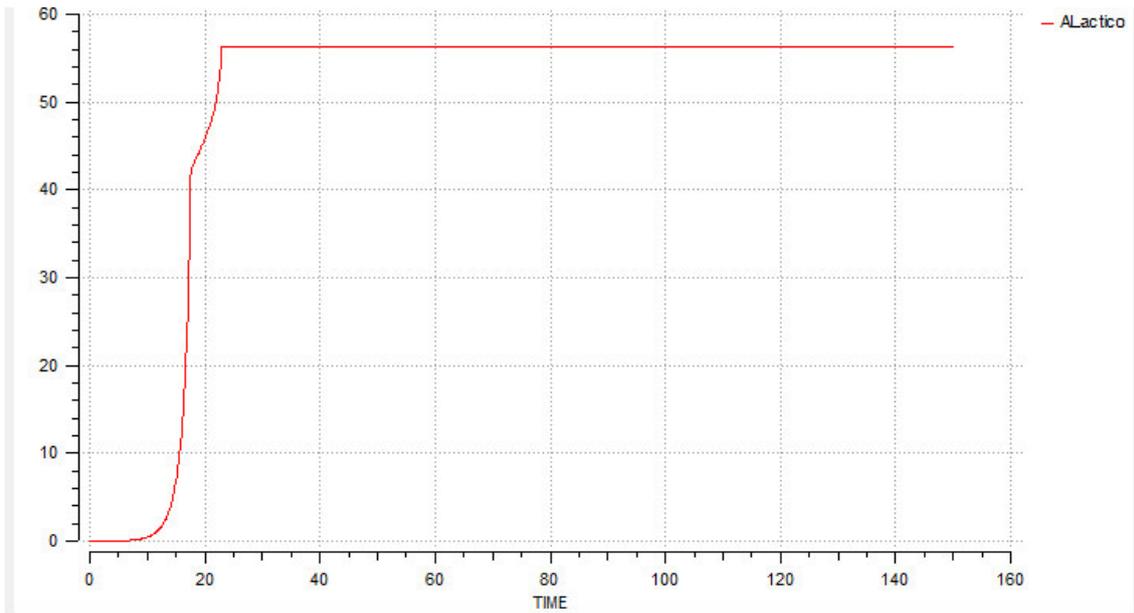


Fig. 12 Simulación en ECOSIMPRO del contenido de ácido láctico durante la fermentación

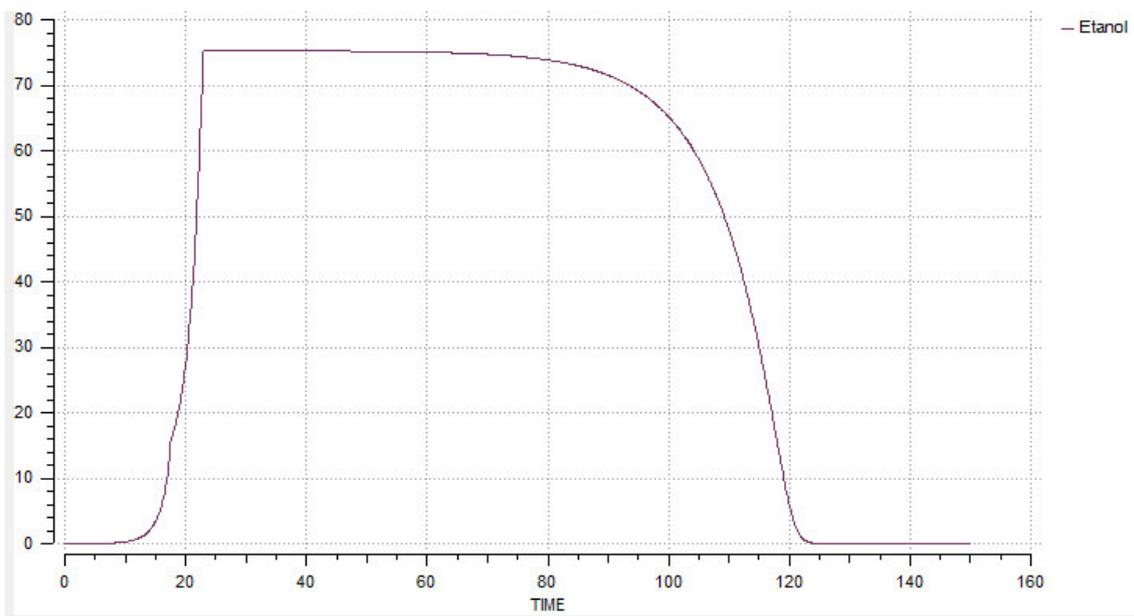


Fig. 13 Simulación en ECOSIMPRO del contenido de etanol durante la fermentación

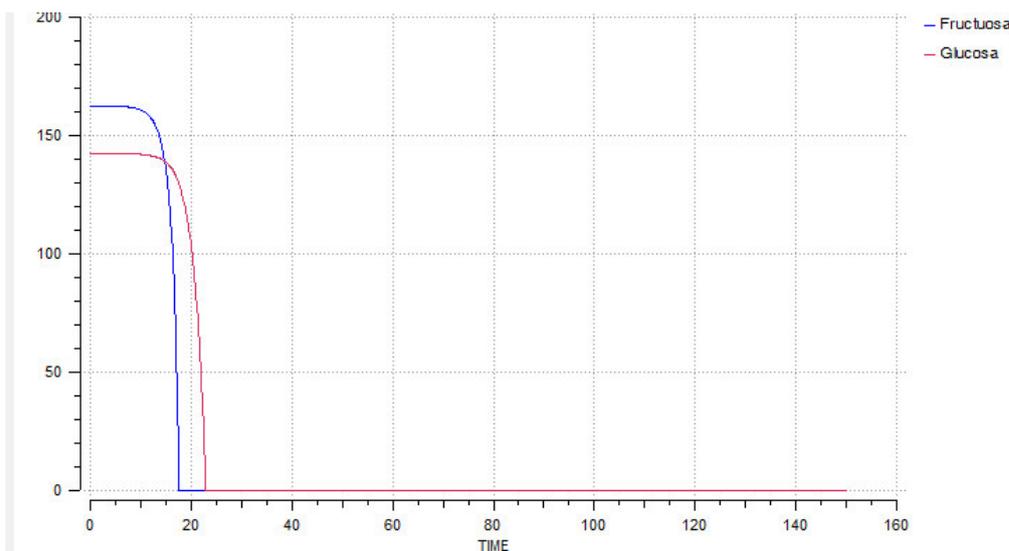


Fig. 14 Simulación en ECOSIMPRO del contenido de azúcares durante la fermentación

5.10. Implementación del Modelo en Matlab usando S-Function.

El modelo matemático descrito en este trabajo ha sido programado en la plataforma “Matlab” con la finalidad de tener una herramienta de simulación que permita evaluar la fermentación del cacao ante diferentes condiciones ambientales. Se programó el modelo usando “S-Functions” las cuales permiten programar bloques de “simulink”, programando en lenguaje C y C++ los cuales son compilados y optimizados durante el tiempo de ejecución del programa.

```
float k10=3.33;
float k11=3.33;
float k12=7.55;
float k13=9.8;
float kd1=0.005;
float kd2=0.01;
float kd3=0.03;

if ((u0[0]>=15) && (u0[0]<=55)) {
    umax1 = -0.0003*pow(u0[0],2)+0.034*u0[0]-0.4103;
}else{
    umax1=0.01;
}

if ((u0[0]>=28.5) && (u0[0]<=47)) {
    umax2 = -9.5086+0.5368*u0[0]-0.0071*pow(u0[0],2);
}else{
    umax2=0.01;
}

if ((u0[0]>=24) && (u0[0]<=47)) {
    umax3 = -1.5739+0.0996*u0[0]-0.0014*pow(u0[0],2);
}else{
    umax3=0.01;
}

r1=umax1*(xC[0]/(k1[0]+xC[0]))*xC[5];
r2=umax2*(xC[1]/(k2[0]+xC[1]))*xC[6];
r3=umax2*(xC[0]/(k3[0]+xC[0]+pow(xC[0],2)/ksi3[0]))*xC[6];
r4=umax3*(xC[2]/(k4[0]+xC[2]+pow(xC[2],2)/ksi4[0]))*xC[7];
if (xC[0]<0) {
    dx[0]=0;
    xC[0]=0;
}
```

Fig 15 Extracto del código implementado en lenguaje C para las “S-Functions”

El modelo de balance másico fue integrado en un bloque de simulink para poder ser procesado e incluir como variable de entrada la temperatura ambiente medida durante los días de fermentación, así como la humedad en el cajón de fermentación durante el proceso.

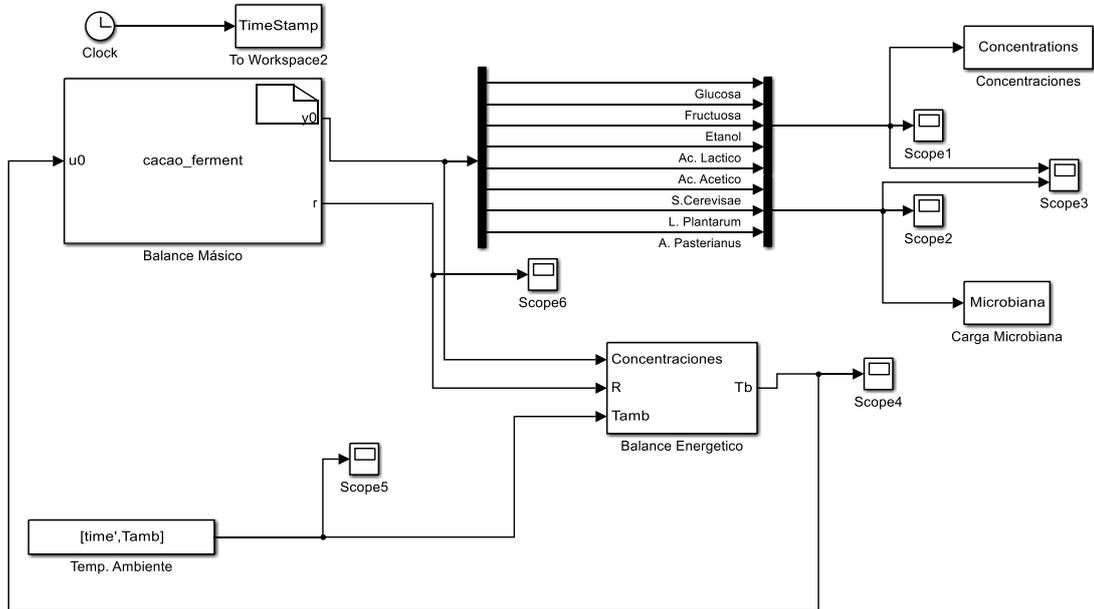


Fig 16 Modelo de Simulink del Modelo de Fermentación del Cacao.

Capítulo 5: Resultados y Discusiones.

Según el modelo expuesto en el capítulo anterior se realizaron simulaciones con condiciones reales medidas durante el proceso de fermentación, como la temperatura ambiente y la humedad durante cada día. Para poder conocer el final de la fermentación se ha implementado un sistema de monitoreo de y visualización de parámetros morfológicos mediante mediciones no invasivas de CO₂ y O₂.



Fig 17 Sistema de Monitoreo Desarrollado para validación del modelo.

5.1. Materiales y Métodos

Para validar el comportamiento del modelo para describir las interacciones bioquímicas, se han usado datos experimentales realizados por la Universidad Federal de Lavras, Brazil, en el trabajo "*Spontaneous cocoa bean fermentation carried out in a novel-design stainless Steel tank: Influence on the dynamics of microbial populations and physical-chemical properties*".

El experimento fue conducido en un campo de cacao de la ciudad de Itajuípe, Bahia, Brazil. Bellotas completamente maduras de cacao fueron cosechadas y abiertas directamente para entrar en la etapa de fermentación. La fermentación fue realizada en cajones de 1 metro cúbico, almacenando hasta 600 kg de cacao. Las cajas de madera fueron lavadas con detergente y agua destilada. Los cajones de madera fueron cubiertos con hojas frescas de banano y todas las fermentaciones fueron hechas en triplicado y la remoción fue realizada cada 24 horas. Cada 12 horas durante el proceso de fermentación, 200 gramos de cada muestra fue recogida aleatoriamente, ubicada en bolsas estériles y transferidas al laboratorio.

Las muestras recientemente adquiridas fueron ubicadas en 4 medios de cultivos apropiados y diluidos para la enumeración de las unidades formadoras de colonia. Posteriormente las muestras fueron incubadas a 30 grados centígrados por 3 días en cultivos con nutrientes. Finalmente cada colonia fue morfológicamente caracterizada y contada.

Para los análisis físico-químicos, los granos y la pulpa fueron físicamente separados, de acuerdo al protocolo de *Ardhana* y *Fleet* [36]. La presencia de alcoholes, ácidos orgánicos y carbohidratos fueron determinados para la pulpa y para el grano por un análisis cromatográfico líquido de alto rendimiento o HPLC (High-Performance Liquid Chromatography) equipado con una columna HPX-87H conectada a un detector RI. Todos los análisis fueron realizados en triplicado y los valores promedio y sus desviaciones estándar fueron usados para validar el modelo propuesto.

5.2. Plataforma de Adquisición de datos.

Para la adquisición de datos de temperatura, CO₂ y O₂, se desarrolló una plataforma basada en sistemas embebidos. Para ello se ha implementado un sistema de monitoreo independiente para cada etapa y se reportan los datos obtenidos por medio de comunicación TCP/IP hacia un computador central que se encarga de almacenar los datos y controlar la comunicación.

5.2.1. Procesamiento de Señales.

Para el procesamiento de las señales adquiridas fue necesario realizar un filtrado de la señal con la finalidad de disminuir el ruido presente. Gracias a las bondades del sistema PSoC se implementó un filtro Butterworth pasa bajos de segundo orden usando la estructura "switched capacitor block" descrita anteriormente.

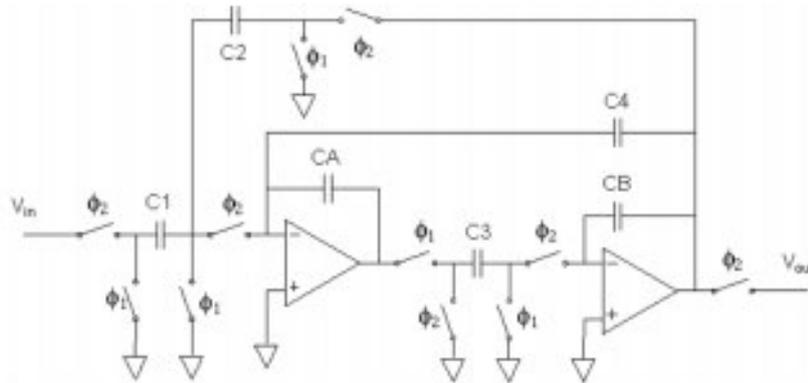


Fig 18 Filtros analógicos integrados en un PSoC.

Para la configuración del filtro se puede implementar manualmente la configuración de los tiempos de frecuencia en los switch, o se puede usar el toolbox incluido en el IDE que mediante un algoritmo predefinido estima los coeficientes que satisfagan la frecuencia de corte requerida. También podemos observar la forma del filtro real en comparación al estimado. Adicionalmente se programó una frecuencia de muestreo baja para evitar problemas de establecimiento de la señal a la entrada del dispositivo PSoC1.

Como resultado se obtuvieron resultados notables entre la señal previa al filtrado y la señal entrante al PSoC 5. En la siguiente figura la señal azul es la figura cruda suministrada por el sensor y la señal verde es la señal luego de pasar el filtro Butterworth.

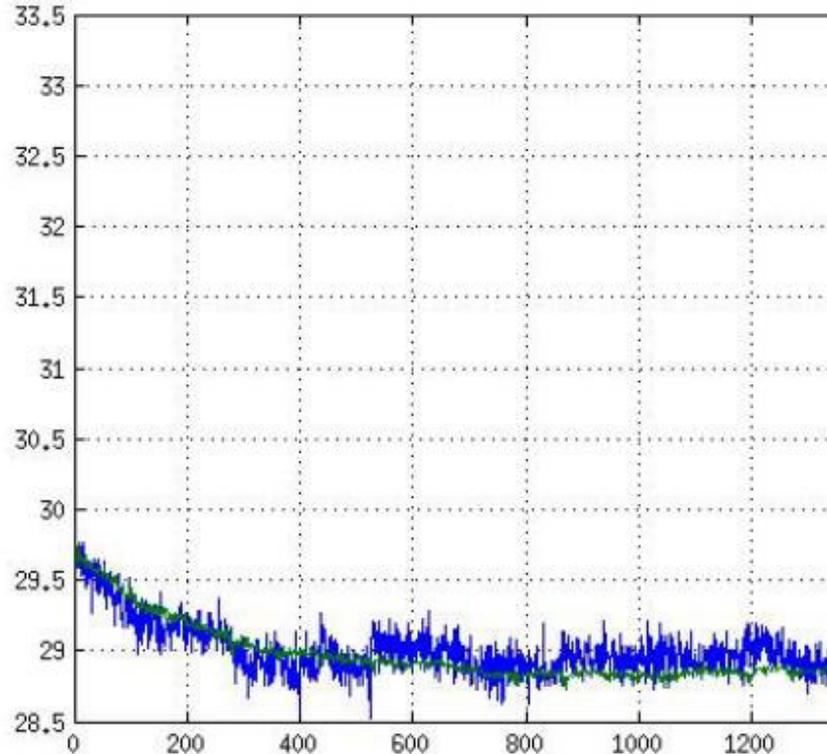


Fig 19 Resultados de Filtrado de la señal. Señal directa del sensor (Azul), Señal Filtrada (Verde)

El sistema implementado fue validado con transductores industriales y sus correspondientes sistemas de adquisición, con la finalidad de asegurar que los datos tomados sean confiables. En la figura 20 aparece la respuesta del sistema implementado y un sistema industrial de la marca PR Electronics, ante condiciones normales de operación.

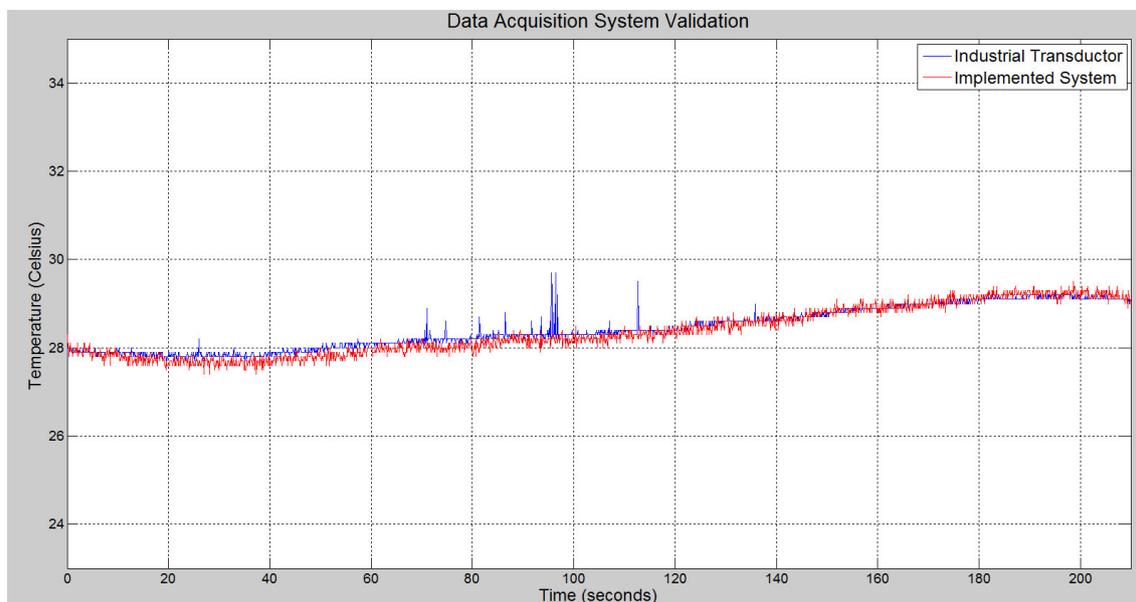


Fig 20 Comparación de Respuesta entre el sistema implementado y una plataforma industrial.

Para los transductores de CO₂ se usó el módulo Telaire 6613 que usa el espectro NDIR por difusión para medir las PPM en un medio y envía la información por un protocolo serial. El transductor de oxígeno es el módulo GMS-10 RVS el cual es basado en dos discos de zirconia. Ambos sensores tienen sistemas de autocalibración y responden a condiciones industriales.

Para el dióxido de carbono se implementó un filtro Weibull ya que la señal cruda era muy susceptible a interferencias durante la operación. En la figura 21 se puede observar la respuesta de dos filtros con la señal cruda. En el caso de la señal del sensor de oxígeno, se aplicó un filtro Gauss para disminuir la influencia del ruido y el resultado se muestra en la figura 36, se observa la gran presencia del ruido en la señal.

En el caso del filtro Gauss para el dióxido de carbono se observó un “bias” entre la señal del sensor y la señal filtrada debido a que la desviación estándar del comportamiento del sensor era elevada, y por ello presentaba un sesgo positivo. Para el filtrado de la señal del sensor de oxígeno, este filtro presentó un comportamiento mucho mejor, inclusive frente al filtro Weibull.

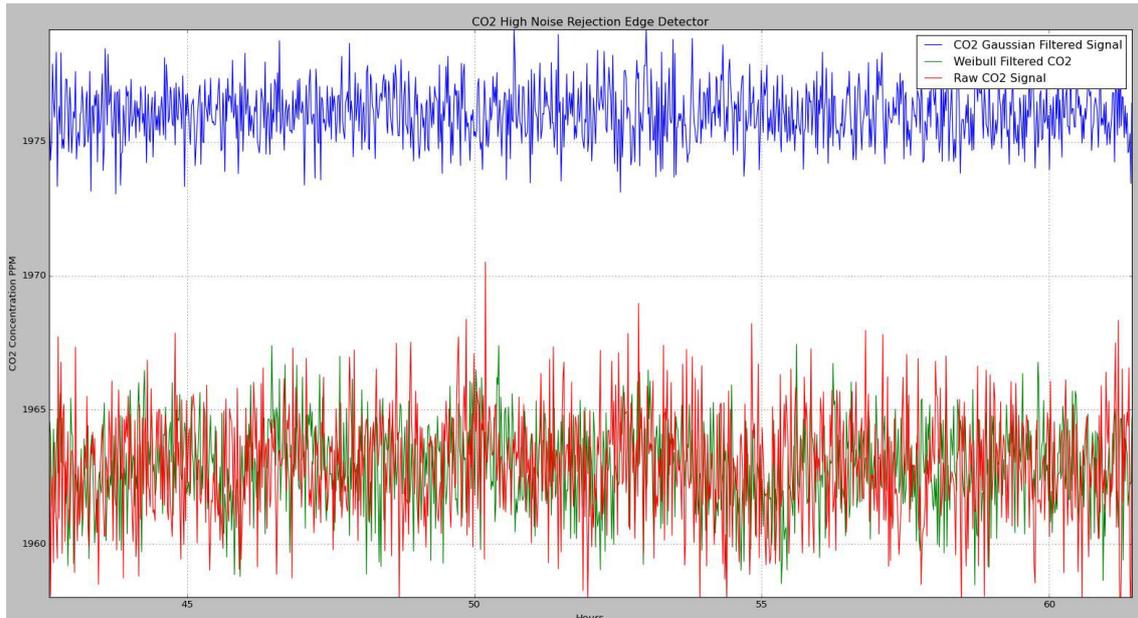


Fig 21 Procesamiento de Señales de Dióxido de Carbono.

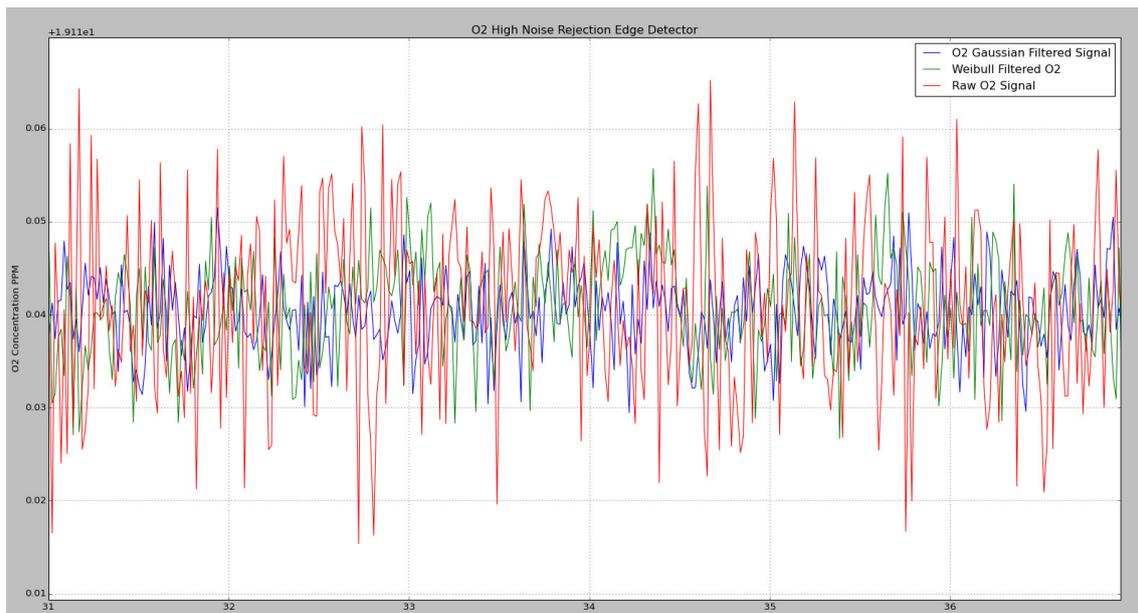


Fig 22 Procesamiento de Señales de Oxígeno.

Como puede verse en la figura 21 la señal directa del sensor tiene un ruido mayor que las señales filtradas. Finalmente se eligió el filtro de Weibull para la señal de Dióxido de Carbono y el filtro de Gauss para el Dióxido de Carbono.

5.2.2. Datos obtenidos por la plataforma de adquisición de datos.

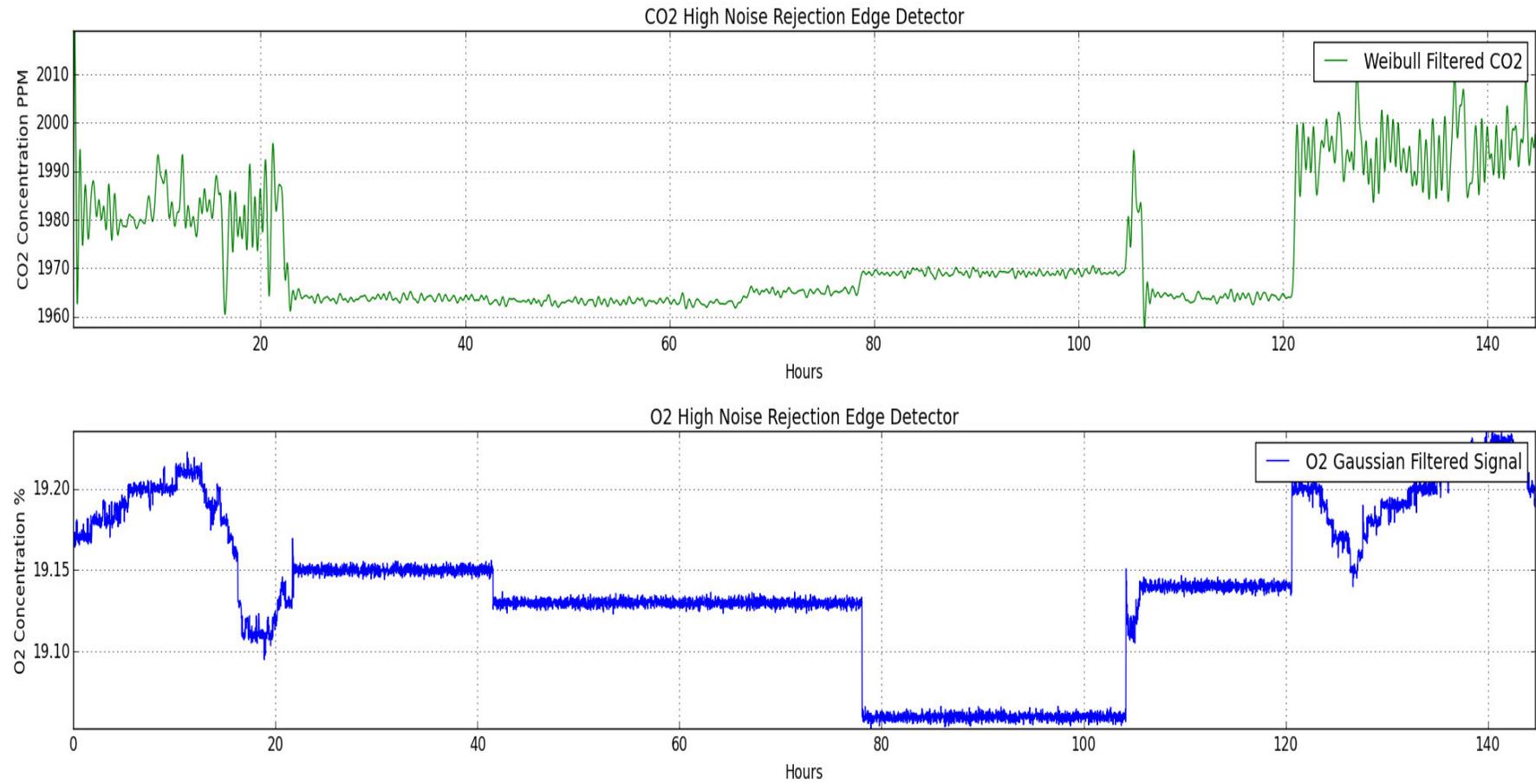


Fig 23 Dióxido de Carbono durante el proceso de fermentación (figura superior) y Óxígeno durante el proceso de fermentación (figura inferior).

Como se puede apreciar en la figura 23 las primeras 20 horas del proceso existen una alta interacción y poca estabilidad en la producción de CO₂ y el consumo de O₂, esto es porque en la etapa inicial la carga microbiana es elevada y más de un proceso metabólico se inicia. Luego del primer día los niveles se estabilizan ya que empiezan las fases predominantes de la fermentación. El oxígeno se mantiene estable hasta el tercer y cuarto día donde empieza la producción de ácido acético y la oxidación del etanol. Esta reacción química se lleva a cabo por las bacterias acéticas y consumen oxígeno durante su desarrollo, es por eso que los niveles disminuyen durante toda esta etapa de forma notable.

Posteriormente a la fase acética existen otras interacciones correspondientes a la degradación de ácido cítrico y formación de ácido fórmico que no se han modelado en este trabajo ya que no tienen un aporte significativo a las características principales del proceso de fermentación. Estas reacciones se dan entre las 105 y 120 horas del proceso. Finalmente, por encima de 120 horas, el proceso de fermentación culmina y aparece predominancia de bacterias formadoras de esporas y hongos, lo cual produce que las medidas de dióxido de carbono y oxígeno se vuelvan poco estables nuevamente.

Según estos resultados se han ajustado los parámetros del modelo en función a los tiempos de inicio y conclusión de cada etapa que se puede observar, así como las pruebas fisicoquímicas realizadas en el trabajo de la Dra. Schwan en Brasil.

5.3. Respuesta del Modelo Matemático.

El modelo fue probado usando como entrada la temperatura ambiente medida durante el proceso de fermentación y la temperatura interna de la masa fermentativa fue estimada por el modelo de balance energético mostrado en capítulos anteriores. La influencia de estas temperaturas en el desarrollo del modelo se evidencia en la figura 38 y 39 donde se compara la respuesta del modelo ante una entrada constante de temperatura ambiente ideal para el proceso de fermentación igual a 40 grados centígrados en la biomasa y la respuesta presentada con temperatura ambiente real

En la figura 24 se observa la relación entre la temperatura ambiente y la temperatura de la masa fermentativa como resultado del modelo propuesto. Se puede ver un incremento inicial en la temperatura debido a la producción de ácido láctico y finalmente en la producción del ácido acético se presencia temperaturas elevadas debido a la reacción altamente exotérmica de la oxidación del etanol. Este comportamiento influencia notablemente el desarrollo del proceso fermentativo debido a que la tasa de crecimiento microbiana de cada familia de bacterias está directamente relacionado a la temperatura.

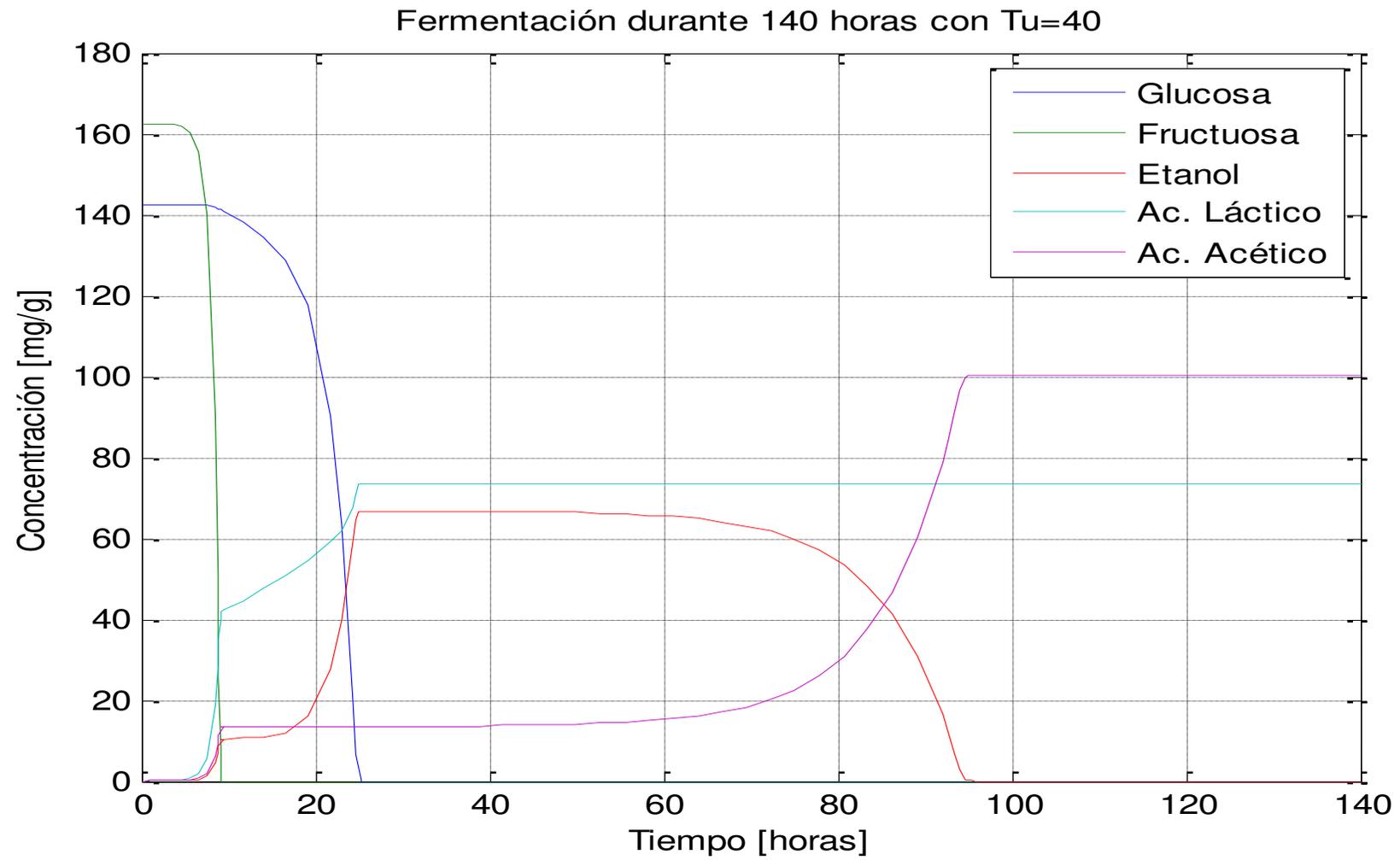


Fig 24 Respuesta del Modelo propuesto con temperatura de la masa fermentativa constante igual a 40 C.

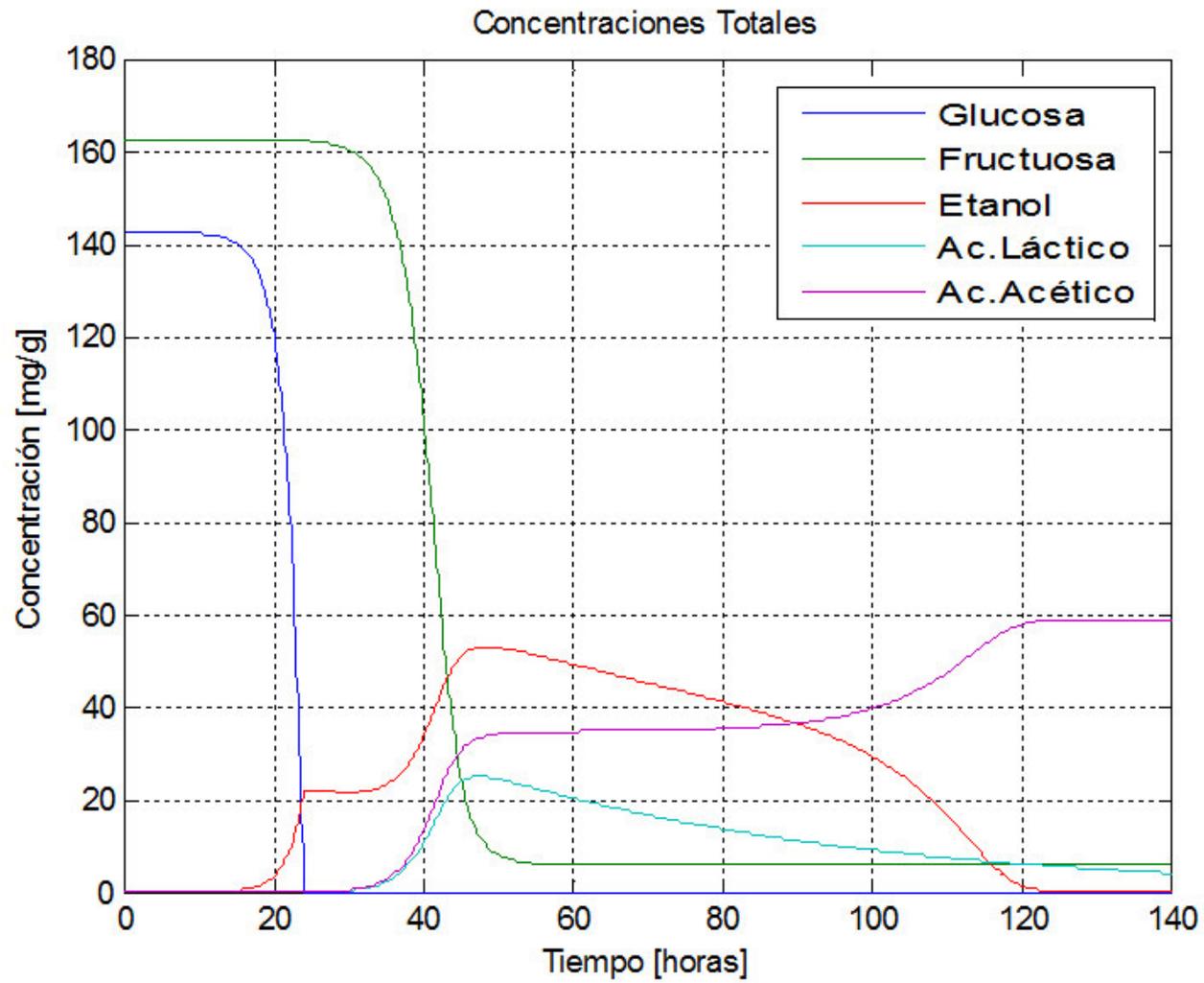


Fig 25 Respuesta del Modelo con Temperatura Ambiente Medida Experimentalmente y Humedad de Masa Fermentativa.

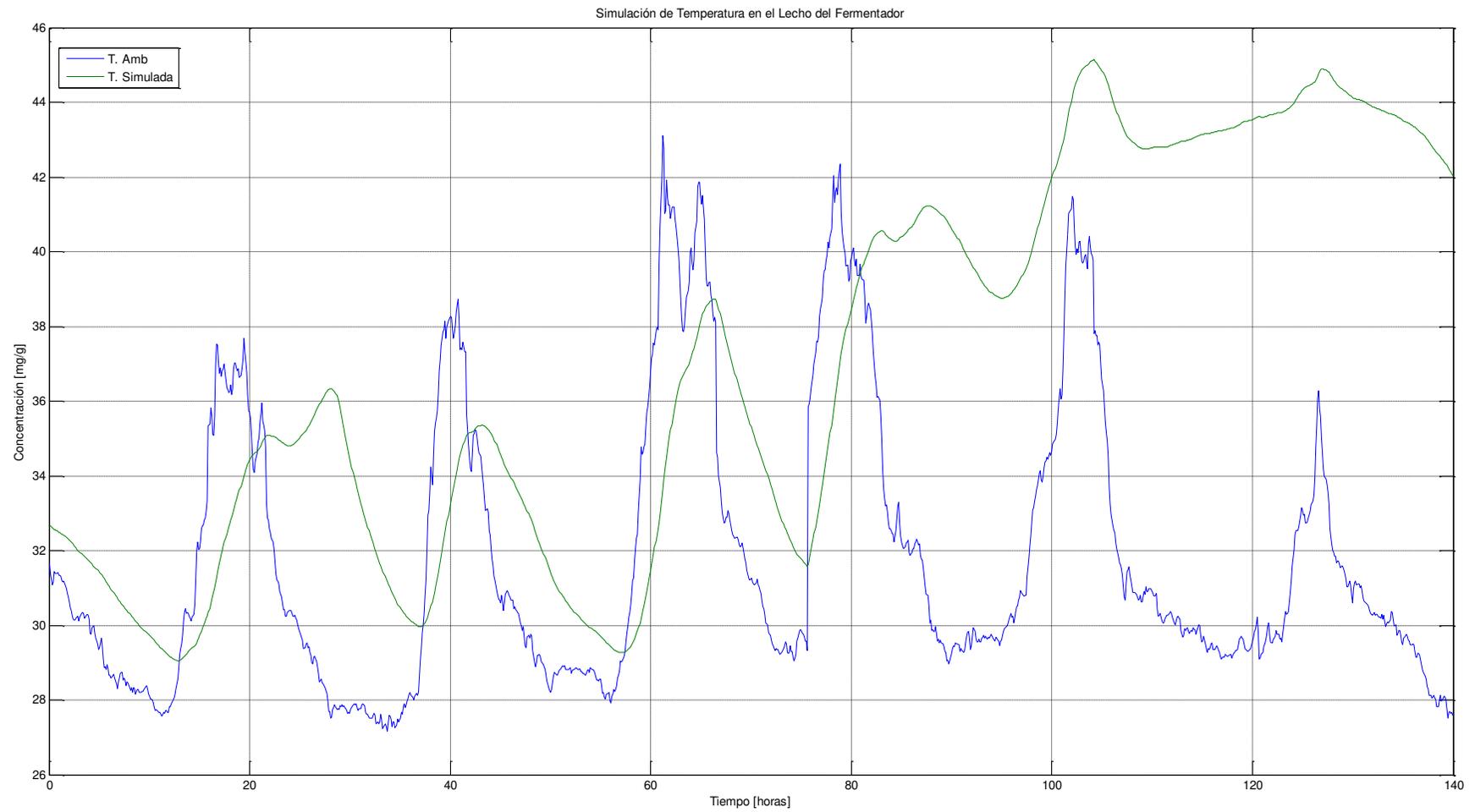


Fig 26 Respuesta de la Temperatura de la Masa Fermentativa (Verde) respecto a la Temperatura Ambiente Medida.

Los productos modelados de nuestro proceso son el ácido acético, quién brinda la característica de astringencia en el cacao y cierto amargor, el etanol que es quién marca la fermentación y el ácido láctica que se debe mantener en niveles controlados para evitar sabores no deseados.

En la figura 26 se puede ver la respuesta del modelo en relación a los datos experimentales obtenidos en Brasil por la Dra. Schwan. La respuesta del modelo describe bastante bien el comportamiento del ácido acético durante la fermentación y presenta un fit de 72%, el cual es un número bastante elevado en modelos de bioprocesos.

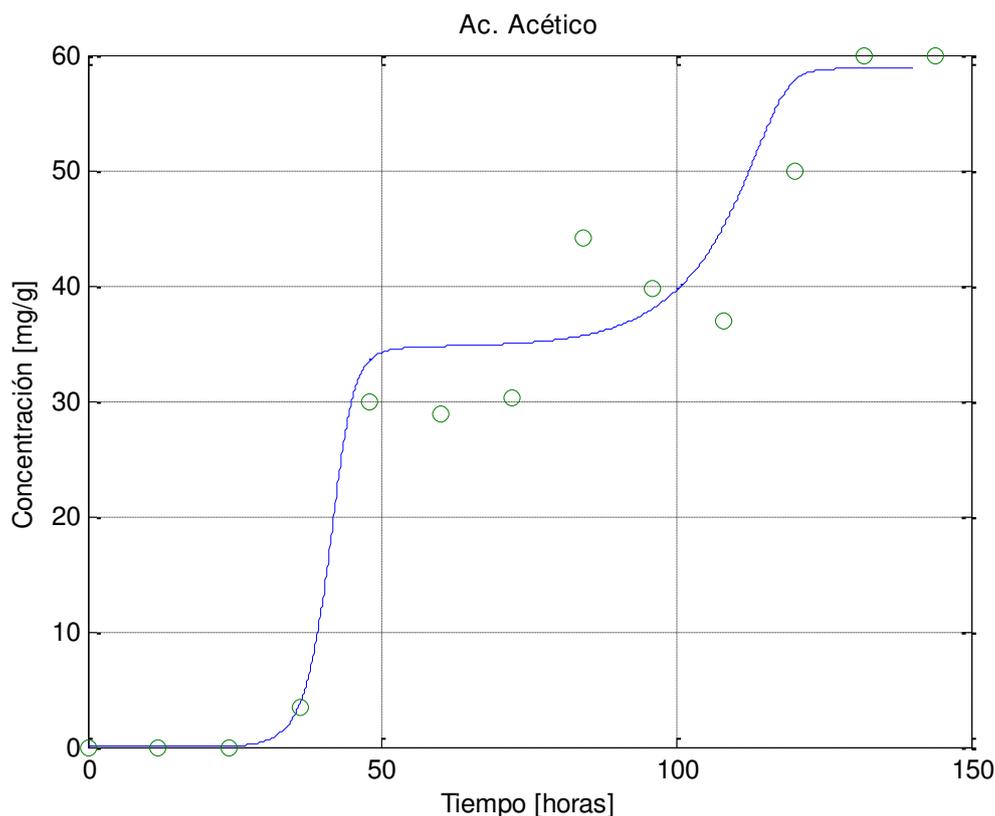


Fig 27 Respuesta del Modelo presentado para el Ácido Acético (Azul) y Datos Experimentales en Verde [40]

La concentración de ácido acético se desarrolla en dos etapas durante la fermentación; en la etapa anaeróbica se genera a partir de la fructuosa luego que la glucosa es convertida en etanol por el proceso de glucólisis, lo cual debe darse entre el segundo y tercer día. En la etapa final de la fermentación el ácido acético es producido por la oxidación del etanol y por la acción de las bacterias acéticas, en este caso la *Acetobacter Pasterianus*. Este comportamiento corresponde mucho a lo esperado según la bibliografía ya que tanto las bacterias lácticas como las acéticas son las encargadas de contribuir a la formación de este producto.

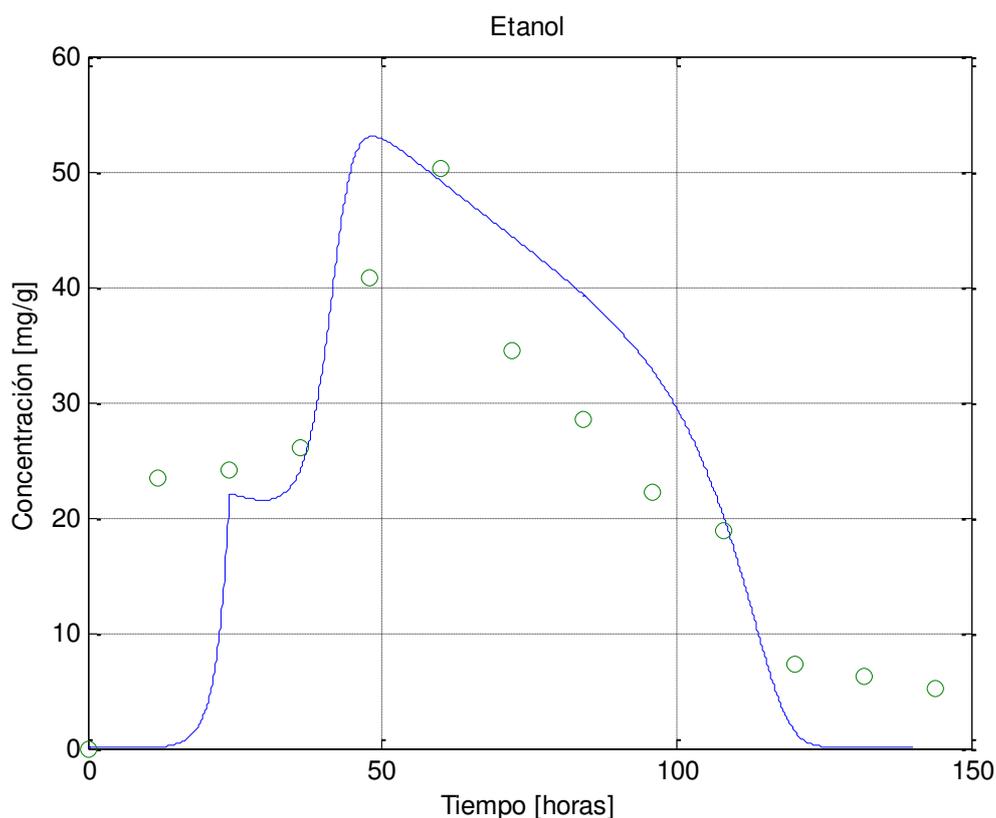


Fig 28 Respuesta del Modelo Propuesto para el Etanol y Datos Experimentales en Verde [40]

En la figura 28 se presenta la respuesta del modelo para la producción de etanol, el cual como se mencionó anteriormente depende de la glucosa y la fructuosa para su producción y luego en la parte aeróbica del proceso se oxida para producir ácido láctico. Adicionalmente a estos procesos metabólicos, el etanol mantiene un proceso de degradación y por lo tanto el proceso de fermentación termina cuando el contenido de etanol en la masa fermentativa es muy pequeño. El fit del modelo en cuanto a los datos experimentales es 56% que es un número normal para este tipo de proceso. Se observa también que para el experimento realizado en Brasil, el proceso de glucólisis empieza aproximadamente a las 10 horas de fermentación mientras que en nuestro modelo inicia luego de 20 horas; esta diferencia es debido a las diferencias en temperatura presentes durante ambos experimentos, debido a que en este resultado se han usado datos experimentales reales tomados en la asociación de productores ASPROBO.

La producción de ácido láctico es descrita en la figura 43 donde se aprecia la producción como efecto de las bacterias lácticas que convierten la fructuosa en ácido y posteriormente es degradado para formar otros compuestos secundarios.

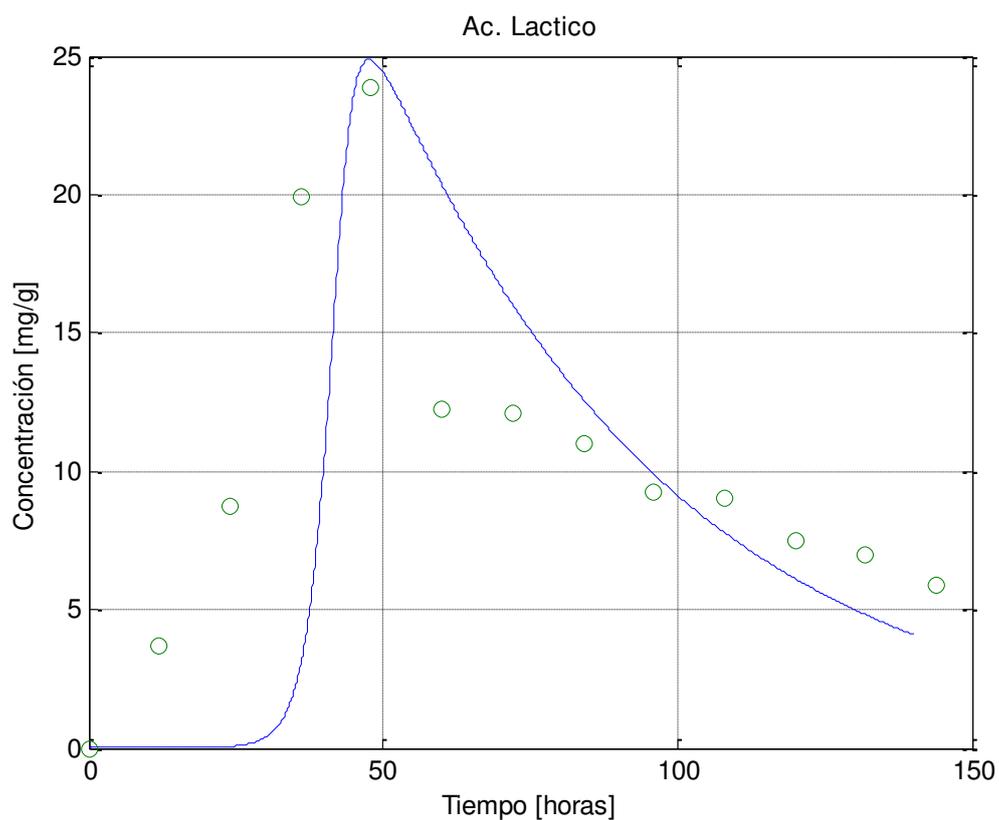


Fig 29 Respuesta del Modelo para la Producción de Ácido Láctico.

En la figura 29 se observa el desarrollo de la concentración de ácido láctico durante el proceso de fermentación y se observa una diferencia en la etapa inicial de los experimentos realizados por en Brasil respecto al modelo propuesto en este trabajo. Esta diferencia es debido a que se está considerando solo una bacteria láctica para la producción de ácido láctico, mientras que en el análisis de identificación de carga microbiana realizada por el equipo de Dr. Schwan se encuentran cuatro variedades distintas de bacterias lácticas.

Estos resultados evidencian la alta complejidad de modelar procesos fermentativos de estado sólido, donde la influencia de parámetros es alta, además en nuestro trabajo se ha evidenciado dos etapas, anaeróbica y aeróbica, lo cual añade una fuente de alta variabilidad para el modelo.

Capítulo 6: Tendencias y Nuevas Líneas de Investigación Propuestas.

6.1. Estrategias de Control Aplicado a Biorreactores de Estado Sólido.

Las estrategias de control aplicadas a biorreactores son variadas según el tipo de fermentación y según el tipo de fermentador. En este proyecto se tiene un proceso de fermentación de estado sólido por lo tanto se enfocarán las estrategias de control adecuadas para ello. Adicionalmente se tienen diferentes tipos de biorreactores según el tipo de fermentación que se esté realizando, ya que estas principalmente pueden ser de tipo “batch” o por lotes, o de tipo continuo donde el flujo de la biomasa que alimenta al biorreactor es continuo, y además según ello se diferencian el tipo de mezclado ya que pueden ser intermitentemente mezclados y continuamente mezclados; finalmente se tiene otra clasificación que depende de la circulación de airea a través del biorreactor, y esta pueda ser forzada o natural [45].

Al margen de la geometría y diseño del biorreactor, las estrategias de control dependen fuertemente del tipo de biorreactor escogido, por ello se plantea tentativamente para este proyecto el diseño de un biorreactor de tambor giratorio, tipo batch y aireación forzada. Esto permite tener inicialmente tres variables controlables o manipulables, que serían la velocidad o frecuencia de mezclado, la temperatura del aire de entrada y la humedad del aire de entrada. Para asegurar que la mezcla se mantiene homogénea y que adicionalmente el sustrato se mantiene concentrado el tiempo suficiente para que se desarrollen las reacciones químicas pertinentes, se va a considerar una velocidad de mezclado baja y

constante, por lo cual se mantendrá fijo su valor y ya no será una variable manipulable propiamente.

Con las consideraciones anteriormente descritas se tendrá un sistema que está compuesto por dos lazos de control, uno que se encargue de variar la temperatura del aire de entrada según la temperatura en la cama del sustrato, y el segundo que controlará el valor de la humedad a la entrada del aire dependiendo de la temperatura del sustrato.

Según investigaciones previas [46] se ha establecido el siguiente esquema de trabajo para el biorreactor.

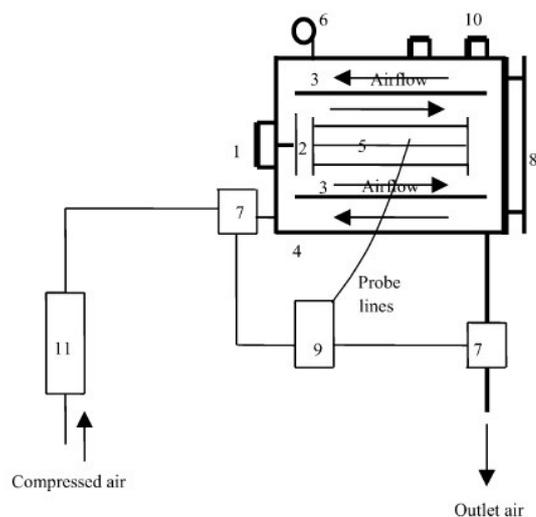


Fig 30 Esquema experimental de un biorreactor de estado sólido tipo batch de tambor giratorio y flujo de aire forzado. (1) Velocidad del motor (2) Aletas (3) Deflectores (4) Envase de Fermentación (5) Contenedor (6) Medidor de Presión de Aire (7) Válvula Eléctrica (8) Manijas (9) Data Logger (10) Puertos de Observación.

En este esquema se puede observar los diferentes componentes de un módulo experimental para un biorreactor de estado sólido. En este trabajo de investigación se comprobó la sensibilidad de la influencia de la temperatura y la humedad del aire a la entrada del biorreactor.

Para este tipo de biorreactores se han estudiado diferentes tipos de estrategias de control, resaltando el trabajo de Oscar F. von Meien [47] donde se compararon dos controladores en un biorreactor de estado sólido usando un modelo de parámetros distribuidos. En este trabajo se comparó el rendimiento de los controladores, un controlador PID y un controlador predictivo DMC para seguir una trayectoria de temperatura ideal, identificada mediante modelos matemáticos, donde se concluyó que el controlador predictivo se acercó más al comportamiento ideal gracias a su facilidad de introducir una trayectoria futura de pasos en la entrada del sistema de control, lo cual facilita las acciones a seguir para seguir un perfil definido. En la siguiente figura se observa el comportamiento de ambos controladores en la producción de biomasa durante la fermentación donde se puede observar claramente la diferencia entre el sistema sin control, usando un controlador PID y usando un controlador DMC.

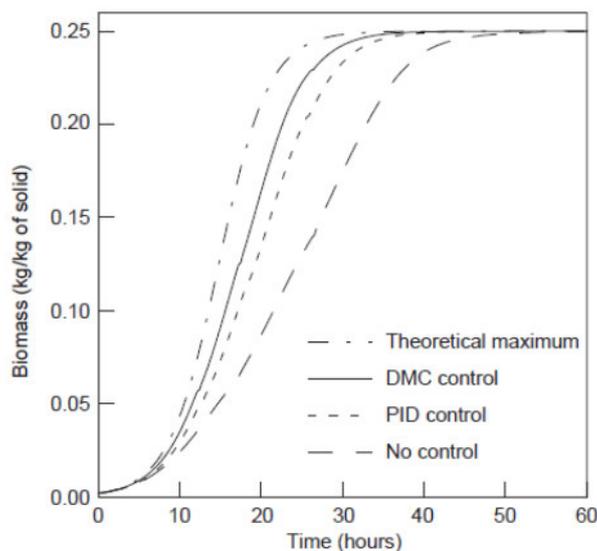


Fig 31 Comparación de controlador PID y controlador DMC para seguimiento de un perfil de temperatura en un biorreactor de estado sólido [47]

Adicionalmente a estos trabajos, el desarrollo de C. Gonzales-Figueredo [48] busca implementar un controlador óptimo para buscar mediante programación no lineal cuál es la configuración de temperatura y humedad adecuada en cada instante de la fermentación para asegurar optimizar la producción de algunos componentes químicos importantes en el producto final (los cuales deben ser previamente identificados mediante un análisis PCM). Esta tendencia de trabajos en control óptimo para biorreactores de estado sólido, aunque se encuentran en una fase relativamente joven, presenta una alternativa atractiva a ser estudiada durante la elaboración del proyecto, en las etapas posteriores.

6.2. Observadores Asintóticos Aplicados a Bioprocesos.

En los procesos de fermentación y de bioprocesos en general, una de las limitaciones más importantes en el monitoreo y optimización de biorreactores se debe principalmente a las mediciones químicas y biológicas de las variables involucradas en el proceso. La medición de la concentración de los principales componentes en los bioprocesos es de gran utilidad, ya que permiten la monitorización y control en línea del proceso. Se suelen tener las siguientes dificultades:

- El costo de los sensores y sus condiciones especiales para la medición (esterilización del sensor).
- Al medir se pueden degradar las propiedades hidrodinámicas de biorreactores complejos.
- Las técnicas de medición son frecuentemente destructivas.
- Se suelen tener solamente disponibles muestras discretas, no necesariamente periódicas, y algunas veces con un tiempo largo de análisis fuera de línea.

Por esta razón se suele optar por estimar el estado interno del biorreactor cuando sólo se poseen algunas medidas disponibles, como lo pueden ser gases, algunos compuestos, pH, humedad, entre otros. La estimación de las variables involucradas en los procesos al no poderse realizar en línea, se realiza en los sensores por software llamados también observadores de estado. Las mediciones por software se realizan con sensores físicos y un algoritmo de estimación, el cuál es el observador de estado, cuyo funcionamiento consiste en estimar un estado incluyendo a su valor real en el proceso.

Se poseen distintos tipos de observadores dependiendo de cuan definido este el modelo, la calidad e inexactitudes del modelo y la data.

Existen diferentes clases de observadores aplicados a bioprocesos, como los observadores asintóticos donde se parte de la hipótesis que existe mayor cantidad de concentraciones medidas que reacciones. A continuación se muestra un ejemplo del comportamiento de un observador asintótico basado en la medición de nitrógeno y la medición de carbono para predecir la concentración de *Pycnoporus cinnabarinus*.

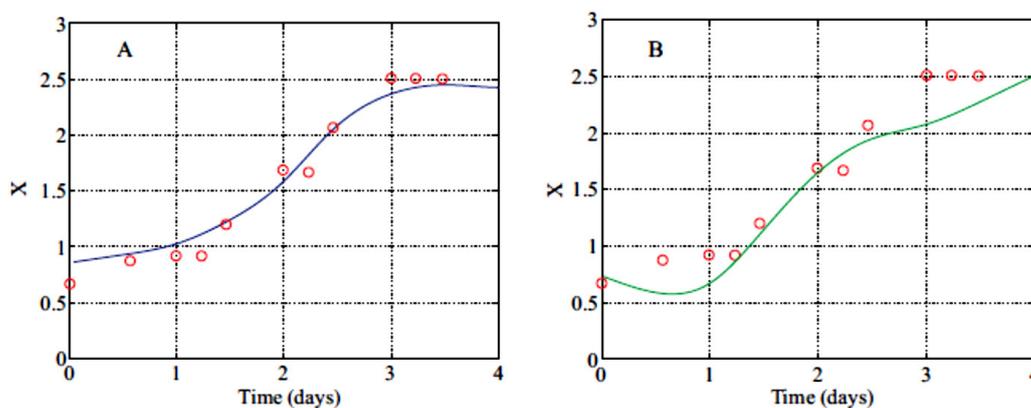


Fig 32 Comparación entre medición directa de biomasa de *Pycnoporus cinnabarinus* (o) y predicciones del observador asintótico basado en medición de nitrógeno (A) y mediciones de carbono (B)

Un enfoque más clásico es la aplicación de observadores de Kalman Extendido para realizar la predicción de biomasa en un cultivo microbiano. En estos casos el objetivo es estimar el comportamiento de la biomasa según su estado anterior y un parámetro adicional medido, que por lo general corresponde a un sustrato. En la figura 59 se puede observar el resultado de la implementación de este tipo de observadores para la predicción de bioalgas.

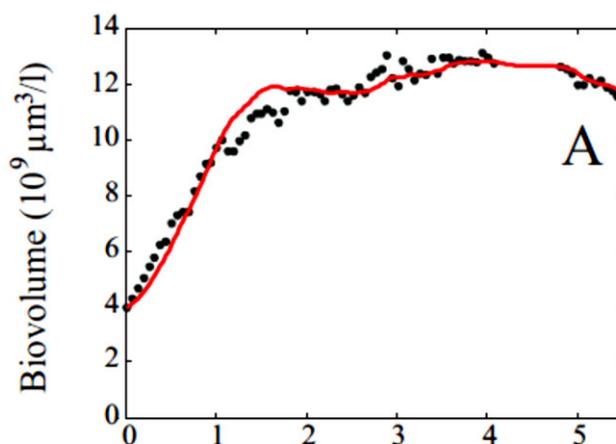


Fig 33 Comparación entre mediciones (o) y predicciones del observador (-) aplicando observador de Kalman Extendido.

De ambos estimadores de estados, el filtro de Kalman extendido podría implementarse a un sistema embebido para la estimación en tiempo real en los reactores (de tambor rotatorio, bandejas o cajones de fermentación) para así poder controlar de una manera más óptima la fermentación en trabajos futuros. El observador asintótico debido a la necesidad de un flujo ingresante de compuestos, presenta una complejidad que no se encuentra planteada para el proyecto actual.

Conclusiones

- La fermentación de cacao ha tenido precedentes en cuanto al cambio de las propiedades organolépticas finales por lo cual se ha demostrado que existe una relación directa entre los tiempos de fermentación, retención, remoción y secado en cuanto a la acidez final del producto.
- Pese a que existen nuevos enfoques en cuanto a los métodos de fermentación, el método más usado hasta el día de hoy sigue siendo la fermentación por cajones. Este método aún presenta problemas en los puntos de concentración de baja temperatura donde proliferan bacterias y la acidez final aumenta.
- Para poder controlar las propiedades organolépticas finales y las concentraciones químicas es necesario aumentar el número de levaduras en la etapa final de tal forma que la metabolización de los azúcares en la etapa inicial se desarrolle de manera más rápida.
- Para controlar la concentración final de ácido láctico se propone la inclusión de glucosa luego de 24 o 48 horas de fermentación debido a que la tasa de crecimiento de las levaduras se inhibe en relación al alto contenido de azúcar inicial, por lo tanto, se recomienda que una vez la tasa de crecimiento microbiano sea elevada se incluya una mezcla de azúcares de rápida metabolización.
- La proliferación de hongos y bacterias formadoras de esporas está directamente relacionada con la aireación del sistema así como los tiempos de remoción. Esto se ha verificado en los trabajos de investigación donde los tiempos de mezclado son mayores a 48 horas y la humedad relativa del ambiente interno de fermentación es elevada.
- Se ha comprobado que se puede realizar un monitoreo del sistema de fermentación de cacao a través de sistemas de medición de concentración de la producción de CO₂ y el consumo de O₂ ya que existen reacciones químicas predominantes que están

directamente relacionada con la concentración de estos dos componentes. Esto propone que se podría desarrollar a futuro un sistema que indique en qué etapa se encuentra el proceso.

- Para el correcto ajuste del modelo es necesario tener más puntos de muestreo del proceso debido a que la naturaleza del modelo es no lineal y por tanto los sistemas de optimización de coeficientes no lineales no garantiza que los algoritmos funcionen sin un punto de inicio de búsqueda cercano al requerido. Esta condición es complicada de alcanzar en sistemas de optimización con más de tres variables (como en el caso del modelo), por lo tanto, se tuvo que ajustar iterativamente los puntos de inicio e ir acotando las áreas de búsqueda el algoritmo.
- Se observa que el comportamiento del modelo frente a temperaturas variables es como se esperaba, existiendo una gran dependencia en la velocidad del proceso debido a la relación de la actividad microbiana con la temperatura de la biomasa.
- Finalmente, se puede usar en el futuro un control que permita manipular la temperatura del flujo ingresante, la velocidad y humedad de este, con la finalidad de mantener en rangos específicos y así lograr obtener resultados deseados en el cacao para que no se sobrepase una temperatura que lleve al desarrollo de ácidos indeseables (que aporten un sabor amargo) al producto final.
- Se ha desarrollado un modelo válido para representar las relaciones bioquímicas presentes durante la fermentación del cacao usando modelos de crecimiento microbiano de Monod y de Haldane
- La concentración de ácido acético empieza solo durante la etapa final de la fermentación lo cual no coincide con los datos experimentales usados en la validación. Esto ocurre debido a que se ha suprimido la reacción química que metaboliza la fructuosa en ácido láctico y ácido acético, por ello se recomienda incluir esta nueva ecuación en el modelo de balance másico para describir apropiadamente los valores experimentales.
- Se recomienda usar un modelo combinado de crecimiento basado en dos sustratos para las bacterias lácticas debido a que al manejarlas por separado se genera una sobrecompensación en la concentración de *Lactobacillus Plantarum*.
- Debido a la relevancia de las levaduras en la parte anaeróbica del proceso se recomienda cambiar el modelo de la constante máxima de crecimiento por uno en función de la temperatura como se ha venido trabajando en modelos avanzados, así como combinar con el modelo de balance energético usando entalpías de reacción.

Bibliografía

- [1]. Advantages of fungal enzyme production in solid-state over liquid fermentation systems” Viniegra-González, G.; Favela-Torrez, E.; Aguilar, C.; Romero-Gómez, S.; Díaz-Godinez, G. y Augur, C. 2011.
- [2]. “Diseño de biorreactores para fermentación en medio sólido.” H. A. Ruíz-Leza, R. M. Rodríguez-Jasso, R. Rodríguez-Herrera. 2013.
- [3]. “Aspectos básicos de la fermentación en medio sólido.” Mónica Lizeth Chávez González. 2011
- [4]. “Design Aspects of Biorreactors for Solid. State fermentation: A review.” H. Kh. Q. Ali and M. M. D. Zulkali. 2014
- [5]. “Application of solid-state fermentation to food industry—A review“. Susana Rodríguez Couto. 2013
- [6]. “Influencia de la fermentación y el secado al sol sobre las características del grano de cacao TSH 565 e ICS 60” Rocío del P. Pineda. 2010.
- [7]. “The microbiology of Cocoa Fermentation and its role in chocolate quality” Rosane F. Schwan. 2015.
- [8]. “Caracterización microbiana, bioquímica y cinética del proceso de fermentación tradicional durante el beneficio de cacao”. Pedro García Alamilla. 2014.
- [9]. “Estudio de los compuestos volátiles de Theobroma cacao L. durante el proceso tradicional de fermentación, secado y tostado.” Jacobo Rodríguez Campos. 2007.

- [10]. “Fermentation, drying and storage of cocoa beans”. Roelofsen. 1958.
- [11]. “Biology.” Neil A. Campbell. 175. 2011
- [12]. “Fructose Dissimilation by Lactobacillus Brevis.” R. W. Eltz. 2014
- [13]. “Fermentaciones microbianas, fermentaciones lácticas de hexosas y pentosas.” Alicia Decheco E. 2008.
- [14]. “Transformaciones bioquímicas durante la fermentación de productos vegetales.” Montaña. 2005.
- [15]. “Fructose Dissimilation by Lactobacillus Brevis.” R. W. Eltz.
- [16]. “. Kinetic Analysis of Strains of Lactic Acid Bacteria and Acetic Acid Bacteria in Cocoa Pulp Simulation Media toward Development of a Starter Culture for Cocoa Bean Fermentation.” Timothy Lefeber, Maarten Janssens, Nicholas Camu. 2010
- [17]. “Establecimiento de parámetros (físicos, químicos y organolépticos) para diferenciar y valorizar el cacao producido en dos zonas identificadas al norte y sur del litoral ecuatoriano.” Ángela Palacios Cedeño. 2004.
- [18]. “Dynamics of volatile and non-volatile compounds in Cocoa during fermentation and drying processes using principal components analysis.” Jacobo Rodríguez Campos. 2009.
- [19]. “Effect of fermentation time and drying temperature on volatile compounds in cocoa.” Jacobo Rodríguez Campos. 2007.
- [20]. “Estudio de los compuestos volátiles de Theobroma cacao L., durante el proceso tradicional de fermentación, secado y tostado.”. Jacobo Rodríguez Campos. 2010.
- [21]. “Manual de Cacao Instituto Interamericano de Ciencias Agrícolas. Turrialba, Costa Rica. 439 p.” Hardy, F. 1961. 2014
- [22]. “Entorno ambiental, genética, atributos de calidad y singularización del cacao en el nor-oriente de la provincia de Esmeralda” Boletín técnico N° 135. 2006
- [23]. Módulo: Tecnología del Cacao; Elizabeth Hernández Alarcón. Universidad Nacional Abierta y a Distancia. Colombia, enero 2010.
- [24]. “Establecimiento de parámetros (Físicos, Químicos y Organolépticos), para diferenciar y valorizar el cacao, producido en dos zonas identificadas al norte y

- sur del litoral ecuatoriano”. Palacios Cedeño Ángela Leonor (Universidad Técnica de Manabí), Ecuador 2008.
- [25]. Tesis de grado previo a la obtención de título de Ingeniero Agroindustrial “Evaluación de Tecnologías para la fermentación del cacao beneficiado CCN-51”. Mirian Nomeí Riera Trelles (Universidad Estatal Amazónica) Ecuador 2009.
- [26]. “Curso sobre el cultivo del cacao”. Gustavo A. Enríquez. Centro Agronómico tropical de Investigación y enseñanza. Turrialba; costa Rica, 1985.
- [27]. Fermente bien su cacao. “Tambor Giratorio una buena opción”. Cooperación Colombiana de Investigación agropecuaria. Universidad Industrial de Santander. 2007.
- [28]. “Análisis químico del cacao criollo Porcelana (*Theobroma Cacao* L.) en el sur del lago de Maracaibo”. E. Portillo, L. Graziano de Farinas y E. Betancourt. Departamento de Agronomía. Facultad de Agronomía. Venezuela 2007.
- [29]. Perfil del Mercado y Competitividad Exportadora del Cacao. 2014. MINCETUR. 2015.
- [30]. Plan Nacional de Desarrollo Cacaotero 2012-2021. Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural – Consejo Nacional Cacaotero. 2012.
- [31]. Programa de Desarrollo Regional PRODER 2014 – Gobierno Regional de Piura. 2015.
- [32]. “Influencia de varios factores sobre características del grano fermentado y secado al sol”. Ligia Ortiz de Bertorelli, Lucia Graziani de Fariñas y Geryaise Royedas. Facultad de Agronomía, Universidad de Venezuela 2009.
- [33]. “Caracterización organoléptica del cacao para selección de árboles con perfiles de sabor de interés comercial”. Viviana Anabel Sanchez. Universidad Técnica Estatal de Quevedo, Ecuador 2007.
- [34]. “Caracterización microbiana, bioquímica y cinética del proceso de fermentación tradicional del cacao”. Pedro García Alamilla. Universidad Autónoma Metropolitana, México Diciembre 2000.
- [35]. . El cacao. Traducido por Hernández C. Editorial Blume, Barcelona, España. 283. P. Braudeau, J. 1970
- [36]. Manual del cultivo de cacao para productores. Unidad ejecutora del programa Corporación de Promoción de Exportaciones e Inversiones CORPEI, y

- Co- ejecutor Asociación Nacional de Exportadores de cacao Anecacao. Borbor,F. y Vera, M. 2007. Enero del 2007. Guayaquil-EC.47p. 2010.
- [37]. Tesis de grado de Doctor en Ciencia en Alimentos. “Estudio de Los compuestos Volátiles de Theobroma Cacao L, durante el proceso tradicional de fermentación de cacao”. Jacobo Rodríguez Campos. (Instituto Politécnico Nacional) México, Junio del 2011.
- [38]. “Cacao.” Traducido por Ambrosio, Tercera edición en español, Mexico, D.F. p. 258 – 267. Wood, G. 1983.
- [39]. “Cacao orgánico, guía para productores ecuatorianos.” INIAP. Manual No. 54. Quito, Ecuador. p. 39 - 294. Enríquez 2004.
- [40]. Estudio de la fermentación del cacao. (Theobroma cacao L.) mediante cuatro sistemas de fermentación en cuatro zonas cacaoteras de Costa Rica. Ramírez. Tesis Ing. Agr. Turrialba Costa Rica. Universidad de Costa Rica 141p. 1998.
- [41]. “Análisis químico del cacao criollo Porcelana (Theobroma Cacao L.) en el sur del lago de Maracaibo”; E. Portillo, L.Graziani de Farinas y E. Betancourt. Departamento de Agronomía. Faculta de Agronomía. LUZ Apdo Postal. Venezuela 2007.
- [42]. “Influencia de Varios Factores Sobre Características Del Grano Cacao Fermentado y Secado al Sol”; Ligia Ortiz de Bertorelli, Lucia Graziani de Fariñas y Gervaise Rovedas. L. Facultad de Agronomía,Universidad Central de Venezuela. 2009.
- [43]. Manual “El beneficio y características físico, químicas del cacao (Theobroma Cacao L.)” Federación Nacional de cacaoteros; Fondo Nacional de Cacao. Colombia. 2010.
- [44]. Beneficio del cacao. In Taller de entrenamiento en calidad física y organoléptica de cacao. Memorias INAP. Quevedo Ecuador. 7 p. Saltos, A; Sánchez V; Anzules A. 2006.
- [45]. “Fermentación”; Asociación Nacional de Cacao Fino de Costa Rica. (www. Canacacao.org) Costa Rica enero 2012.
- [46]. Beneficio del cacao. Fundación Hondureña de Investigaciones Agrícolas, Fasc. Nº 6 p. 14 – 16. Moreno, L.; Sánchez, A. 1989.

- [47]. Manual del cacao. Turrialba Costa Rica. Instituto Interamericano de Ciencias Agrícolas. p. 385 -391. Hardy, 1961.
- [48]. Solid State Fermentation Bioreactors, Fundamentals of Design and Operation. D.A. Mitchell 2012.
- [49]. Temperature control at different bed depths in a novel solid-state fermentation system with two dynamic changes of air. Hong-Zhang Chen. 2005
- [50]. Control strategies for intermittently mixed, forcefully aerated solid-state fermentation bioreactors based on the analysis of a distributed parameter model. Oscar F. von Meien. 2004
- [51]. Optimal temperature tracking of a solid state fermentation reactor. C. González-Figueredo. 2011.
- [52]. “La Ruta del Cacao”. Fundación Telefónica. 2014.
- [53]. Plant diversity effects on crop yield, pathogen incidence, and secondary metabolism on cacao farms in Peruvian Amazonia. Julia S. Kieck, Katharina L.M. Zug. Agriculture, Ecosystems & Environments. Volumen 222. 2016.
- [54]. Fermentation-like incubation of cocoa seeds (*Theobroma cacao* L.) – reconstruction and guidance of the fermentation process. Daniel Kadaw, Nicolas Niemenak, Sascha Rohn. Food Science and Technology. Volume 62. 2015
- [55]. Traditional vs modern production systems: Price and nonmarket considerations of cacao producers in Northern Ecuador. Pilar Useche, Trent Blare. Ecological Economics. Volumen 93. 2013.
- [56]. Increased frequency of phytosanitary pod removal in cacao increases yield economically in eastern Peru. W. Soberanis, R. Ríos, E. Arévalo. Crop Protection. Volumen 18. 1999.
- [57]. Perceptions of governance and social capital in Ghana’s cocoa industry. P. Abbey, Philip R. Tomlinson. Journal of Rural Studies. Volumen 44. 2016.
- [58]. Modeling conversión and transport phenomena in solid-state fermentation: A review and perspectives. Yovia S.P. Rahardjo, Johannes Tramper. Biotechnology Advances 24. 2006.
- [59]. Mathematical models for microbial kinetics in solid-state fermentation: A Review. Davood Mazaheri, Seyed Abbas. Iranian Journal of Biotechnology. Volumen 11. 2013

- [60]. Diseño de Biorreactores para fermentación en medio sólido. H. A. Ruíz-Leza. R. M. Rodríguez-Jasso. Revista Mexicana de Ingeniería Química. Volumen 6. 2007.
- [61]. Design Aspects of Bioreactors for Solid-State Fermentation: A review. H. Kh. Q. Ali, M. M. D. Zulkali. Chemical and Biochemical Engineering Journal. Volumen 25. 2011.
- [62]. Quality of cocoa beans for chocolate manufacturers. Fowler, M.S. 1998. Proceedings of International Cocoa Rsearch Conference.
- [63]. Processing Tropical Crops: A Technological Approach. Asiedu, J.J. Macmillan Press Limited, London. 1989
- [64]. Developmental variations of sugars, carboxylic acids, purine alkaloids, fatty acids, and endoproteinase activity during maturation. Bucheli, P. Journal of the Science of Food and Agriculture. 2001.
- [65]. Cocoa Fermentation. Lopez, A.s. Enzymes, Biomass, Food and Feed. 1995.
- [66]. Observations on the fermentation of West African Amelonado Cocoa. Rohan, T.A. Cocoa Conference. 1960.
- [67]. The microbiology of cocoa fermentation and its role in chocolate quality. Scwhan, R.F., Critical Reviews in Food Science and Nutrition 2004.
- [68]. Beverages, Technology, Chemistry and Microbiology. Varnam, A.H. Chapman & Hall London. 1994.
- [69]. Modelación y estimación de parámetros aplicados al proceso de fermentación de cacao piurano. Tesis para obtener el título de Ingeniero. Christian Miguel Chávez Rodríguez. 2016.
- [70]. Informe de Situación Nacional del Cacao en el Perú. Ministerio de Agricultura del Perú. 2014

Anexos

Anexo 1: Valores de concentración en mg/g de distintos ácido y azúcares.

Fuente: Spontaneous cocoa bean fermentation carried out in a novel-design stainless steel tank: Influence on the dynamics of microbial populations and physical–chemical properties. Gilberto Vinícius de Melo Pereira, Karina Teixeira Magalhães, Euziclei Gonzaga de Almeida Irene da Silva Coelho, Rosane Freitas Schwan

Horas	Sacarosa	Glucosa	Fructosa	Etanol	Ácido Láctico	Ácido acético	Ácido Cítrico
0	20.0000	149.2059	165.5294	0.0941	0.0000	0.0000	15.5294
12	20.5765	52.4118	24.8588	66.3529	15.6941	0.0000	18.8471
24	15.3294	25.5294	56.1294	27.6235	15.3412	16.9412	8.0471
36	14.4235	38.0176	42.6824	29.4588	16.5647	14.3059	7.3176
48	12.1412	22.8529	40.4824	38.7765	18.8000	22.5176	6.4000
60	9.6941	25.1824	44.9059	28.1882	14.6588	21.9765	7.2235
72	7.5647	29.7941	58.5176	13.0353	12.8471	30.8235	5.7412
84	7.0588	27.5941	58.0471	39.4824	11.4471	32.7294	4.9412
96	5.4353	35.0176	46.3882	20.9882	8.2353	32.2118	4.9412
108	4.9412	26.6647	40.0353	20.0471	8.5294	32.7529	4.0941
120	4.2824	17.9176	36.7647	19.1059	8.4588	36.8706	4.6824
132	3.6235	17.4412	34.1529	15.2471	8.0941	37.2471	3.1529
144	3.4588	17.3882	29.8353	14.3059	7.7059	40.6118	1.6471

Anexo 2: Principales Componentes y Reacciones Químicas del Cacao.
Fuente “Modelación y estimación de parámetros aplicados al proceso de fermentación de cacao piurano”. Tesis para obtener el grado de ingeniero. Christian Miguel Chávez Rodríguez. Universidad de Piura. 2016. [69]

Group	Retention time (min)	Compound	Odor quality ^a	Kovats Retention Index ^b	Process stage found ^c	
Aldehydes and ketones	6.54	2-methyl-1-propanal	Malty, chocolate		RC0	
	8.03	Pentanal	Almond, malt, pungent	935	RC0, FC6, FC7, DC1-DC5	
	9.07	2,3-butanedione	Butter		FC3-FC8, DC1-DC5	
	9.51	2-pentanone	Fruit	983	RC0, FC1	
	14.89	Acetoin	Butter, cream	1287	FC1-FC8, DC1-DC5	
	20.25	Phenyl acetaldehyde	Honey, flowery, sweet		RC0, FC1-FC8, DC1-DC5	
	20.51	Acetophenone	Must, flower, almond, sweet	1645	FC5-FC8, DC4	
	20.56	Phenylmethyl ketone			RC0, FC4	
	10.14	1-propanol	Pungent, sweet candy	1037	FC1, FC2	
	11.41	2-methyl-1-propanol	Wine		FC1-FC7, DC1-DC5	
Alcohols	11.75	3-methyl-2-butanol		1052	FC3-FC8, DC1	
	11.93	2-pentanol	Green, mild green	1118	RC0, FC1, FC2	
	18.31	3-methyl-1-butanol	Malty, bitter, chocolate		RC0, FC1-FC8, DC1-DC5	
	18.43	2,3-Butanediol			FC1-FC8, DC1-DC5	
	18.84	1,3-Butanediol		1692	FC1-FC8, DC1-DC5	
	22.38	Benzyl alcohol	Sweet, flower	1865	DC1-DC5	
	22.95	Phenylethyl alcohol	Honey, spice, rose, lilac, flowery, caramel	1925	FC1-FC8, DC1-DC5	
	Esters	6.74	Methyl acetate			FC1-FC8, DC1-DC5
		7.43	Ethyl acetate	Pineapple	907	FC1-FC8, DC2-DC5
		9.67	Isobutyl acetate	Fruit, apple, banana	1015	FC5-FC7, DC2-DC5
10.65		3-methyl-2-butanol acetate			FC2, DC2-DC5	
10.82		2-phenylacetate			FC4	
11.87		3-methyl-1-butanol acetate			FC2-FC8, DC2-DC5	
15.63		Ethyl lactate	Fruit	1358	FC1-FC5	
21.82		Ethylphenyl acetate	Fruit, sweet, honey	1773	DC4, DC5	
21.98		2-phenylethyl acetate	Rose, honey, tobacco, flowery	1829	FC4-FC8, DC1-DC5	
22.15		Ethyl laurate	Leaf, fruity, floral	1842	FC1-FC7, DC4	
Acids	28.45	Ethyl palmitate	Waxy, mild green		FC3-FC4	
	16.92	Acetic acid	Sour, astringent, vinegar	1450	FC1-FC8, DC1-DC5	
	18.26	Propanoic acid	Pungent, rancid, soy	1523	FC5-FC8	
	18.50	Isobutyric acid	Rancid, butter, cheese, hammy	1563	FC3-FC8, DC1-DC5	
	19.4	Butanoic acid	Rancid, cheese, sweat	1619	FC2	
	19.75	Isovaleric acid	Sweat, acid, rancid	1665	FC2-FC8, DC1-DC5	
	21.75	Hexanoic acid	Sweat, pungent, sickening, rancid, sour	1829	FC2-FC8, DC1-DC5	
	24.40	Octanoic acid	Sweat, cheese, oily, fatty	2083	FC2-FC8, DC1-DC5	
	25.97	Nonanoic acid	Green, fat	2203	FC2-FC5, DC1-DC5	
	34.43	Dodecanoic acid	Metal	2517	RC0, FC2-FC5	
Pyrazines	37.87	Bencenacetic acid			DC3	
	18.14	Tetramethylpyrazine	Milk-coffee, roasted, chocolate	1458	DC2-DC5	

Fig A1 Componentes volátiles identificados durante el proceso de fermentación y secado, por cromatografía gaseosa usando espectrometría másica en cacao mexicano. Fuente [18]

La composición del cacao al finalizar la fermentación y el secado se puede observar en la Figura A1. El cotiledón o pulpa del cacao es un medio ideal para el crecimiento de microorganismos. Antes de la fermentación presenta entre 82-87% de agua, 10-15% de azúcares (de este 60% es sacarosa y 39% es una mezcla entre fructosa y glucosa [7]), 2-3% de pentosas, 1-3% ácido cítrico y 1-1.5% de pectinas [10]. La acidez inicial de la pulpa se debe al ácido cítrico junto con bajos niveles de oxígeno.

Tabla A1 Composición química para el cacao fermentado y seco. Fuente [17]

Componentes	Fermentado y seco (%)	Cáscara (%)	Germen o Radícula (%)
Agua	5,00	4,50	8,50
Grasa	54,00	1,50	3,50
Cafeína	0,20		
Teobromina	1,20	1,40	
Polihidroxifenoles	6,00		
Proteína bruta	11,50	1,90	25,10
Mono- oligosacáridos	1,00	0,10	2,30
Almidón	6,00		
Pentosanos	1,50	7,00	
Celulosa	9,00	26,50	4,30
Ácidos carboxílicos	1,50		
otras sustancias	0,50		
Cenizas	2,60	8,00	6,30

El contenido de grasas en los granos tiende a descender (de 50-55% en granos no fermentados a 48-52%) luego de la fermentación, mientras que en el licor del cacao las grasas representan un contenido del 50-58% [17]. El contenido de polifenoles disminuye por hidrólisis, polimerizaciones, entre otros, disminuyendo la astringencia y el sabor amargo del cacao. Con respecto a ácidos como el acético, cítrico, láctico, el contenido varía de distinta manera dependiendo de la etapa del proceso, siendo el predominante al finalizar la fermentación el ácido acético.

Debido a la numerosa cantidad de compuestos volátiles surgidos durante la fermentación, se ha usado frecuentemente el análisis por componentes principales. El análisis por componentes principales es un método estadístico para datos métricos que nos permite interrelacionar variables de un banco de datos a un número menor de éstas perdiendo la menor cantidad de información posible.

En el trabajo de Jacobo Rodríguez Campos [18] se propuso obtener los componentes volátiles que afectan mayormente a la fermentación, eligiendo como variables las variaciones en el pH y en la concentración de ácido láctico y acético. Se encontró que con dos componentes principales (PC1 Y PC2) se puede explicar el 61% de la varianza. en la Figura A2 se puede apreciar PC1 Y PC2 graficados. En PC1 tienen mayor peso el acetato de metilo, acetoina, 2,3-butanodiol, acetato feniletílico, 3-metil-1-butanol acetato y los ácidos succínico, láctico y málico, mientras que los que tienen menor peso fueron la sacarosa, los ácidos cítricos, oxálico, dodecanoico, el alcohol 2-pentanol, fenilacetaldeido y el valor del pH. De los anteriores, los que poseen una mayor concentración durante la fermentación fueron el acetato de metilo, acetoina, ácido láctico y 2,3-butanodiol. Mientras que en PC2 los más positivos (mayor peso) fueron los ácidos isobutírico, isovalérico y propanoico, y los menores fueron el lactato etílico, ácido nonanoico, acetato etílico, 3-metil-1-butanol y 2,3 butanodiol. Finalmente se sugiere usar como indicadores del sabor y fermentación a la concentración durante la oxidación del 3-metil-1-butanol a 3-metil-1-butanol acetato, así como también se deja pendiente encontrar las

concentraciones óptimas de los componentes volátiles óptimos en la fermentación que caracterizan a los componentes principales calculados; también se indica que la fermentación no debe permitir que la concentración de ácido láctico y acético aumente demasiado porque decrece la calidad del producto, lo que normalmente sucede al tercer día de fermentación.

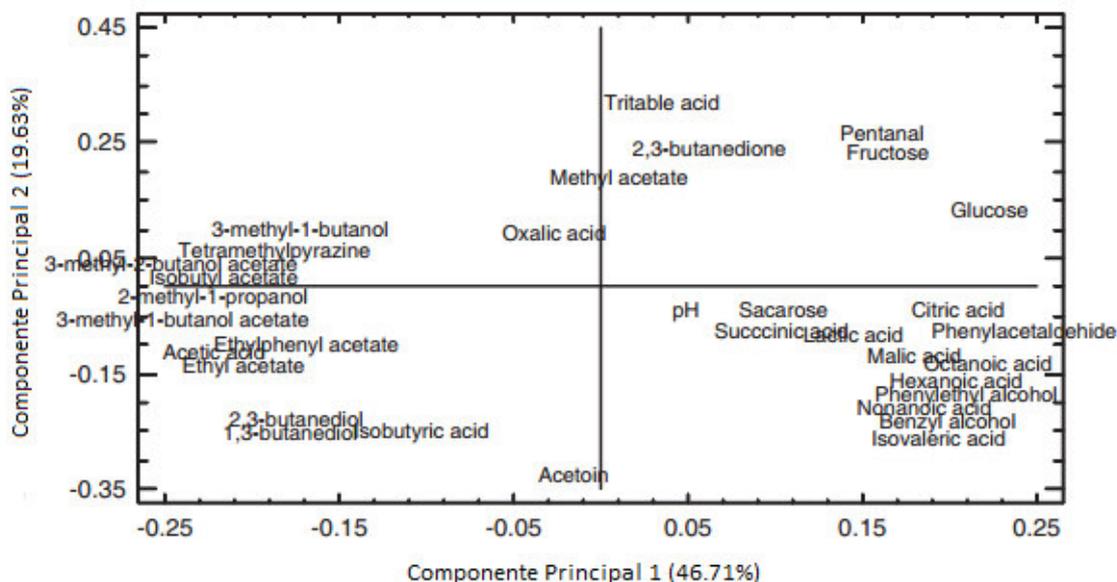


Fig A2 Principales componentes (PC1 y PC2) para pH, azúcares, ácidos, entre otros. Fuente [18]

A2.1. Principales reacciones químicas

A lo largo de la fermentación se sigue una sucesión microbiana como se puede observar en la Figura A3. Al inicio del proceso se desarrollan levaduras, luego bacterias lácticas, acéticas, bacterias formadoras de esporas aerobias. Cada etapa tiene un tipo de microorganismo predominante que produce compuestos volátiles y no volátiles.

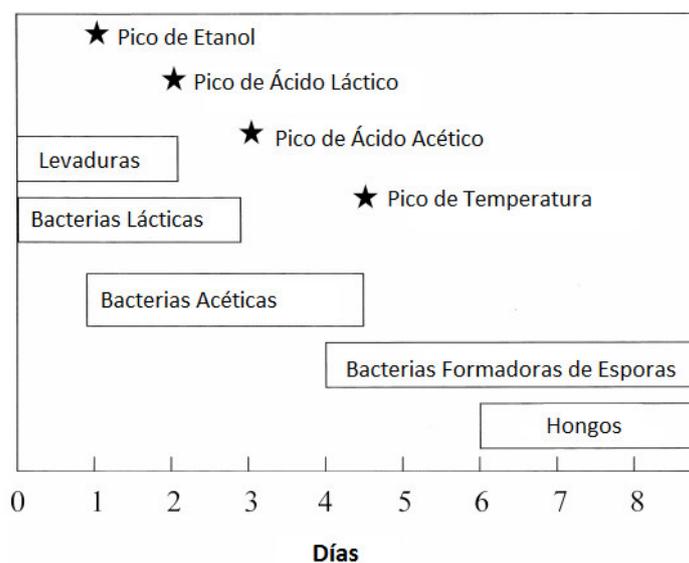
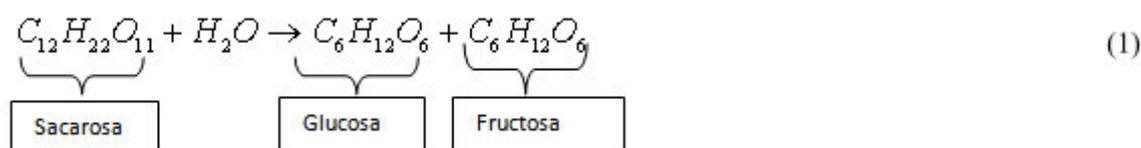


Figura A3. Sucesión microbiológica y los principales compuestos a lo largo de los días de fermentación. Fuente [7]

Como se dijo anteriormente, las levaduras producen alcohol degradando sacarosa, primero invirtiendo esta en azúcares residuales como glucosa y sacarosa

Las levaduras causan la inversión de la sacarosa, produciendo glucosa y fructuosa, para posteriormente ayudar en la producción de etanol, CO₂ y enzimas pectinolíticas (Ecuación (1)). De igual manera descompone el ácido cítrico incrementando el pH, produce más ácidos orgánicos como acético, oxálico, fosfórico y málico en menores proporciones, y otros ácidos volátiles (alcoholes, ácidos grasos, esterres, entre otros). La variedad de levadura más dominante durante la fermentación fue la *Saccharomyces cerevisiae*. La concentración de levaduras disminuye a medida que aumenta la producción de alcoholes, debido a la intolerancia por parte de las levaduras al alcohol.

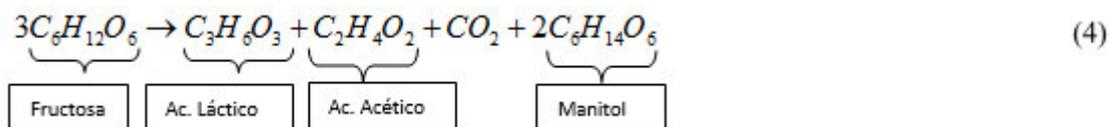


Luego de que se eleva la concentración de glucosa en el mucílago, se inicia la glucólisis, la cual es parte de la fermentación alcohólica y proporciona energía a los microorganismos en medio anaeróbicos [13], produciéndose etanol y dióxido de carbono [11][13] por la vía Embden-Meyerhof como se observa en la Ecuación (2).



Durante la fase anaerobia se desarrollan también las bacterias lácticas, metabolizan azúcares residuales y ácidos para producir ácido láctico, acético, alcoholes, entre otros. Hay dos tipos de bacterias lácticas: homolácticas y heterolácticas. Las primeras emplean la vía Embden-Meyerhof para fermentar glucosa y fructosa y producir ácido láctico si es en ausencia de oxígeno, si ese no es el caso se formará ácido pirúvico [13] (Ecuación (3)). Las heterolácticas usan la vía hexosas monofosfato para metabolizar glucosa y fructosa, y así producir dióxido de carbono, etanol, ácido láctico, ácido acético y glicerol [15] como se observa en la Ecuación (4) y que se da generalmente con la especie *Lactobacillus brevis*. La bacteria *Lactobacillus Plantarum* posee las enzimas necesarias para realizar las dos vías fermentativas, siguiendo el modelo heterofermentativo se da la reacción presente en la Ecuación (5) [13]. Se ha encontrado que las bacterias *Lactobacillus plantarum* y/o *Lactobacillus fermentum* dominan generalmente la fermentación al inicio produciendo ácido acético, ácido láctico y manitol, lo que incrementa el pH del mucílago [16].





La metabolización del ácido cítrico es también realizada por bacterias lácticas (principalmente por *Lactobacillus plantarum* y *Lactobacillus fermentum* [16]), convirtiéndolo principalmente en ácido láctico como se puede observar en la Ecuación (6). Otras investigaciones sugieren que el ácido cítrico es convertido en ácido acético y dióxido de carbono solamente [16].

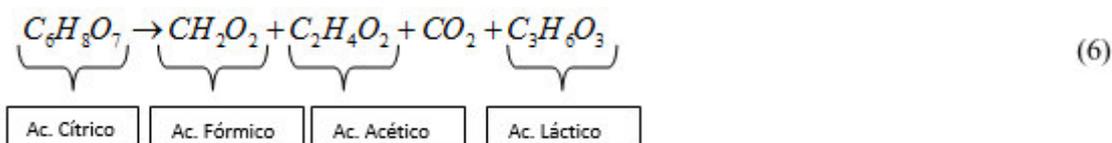


Tabla A2. Principales especies de bacterias lácticas aisladas de distintas fermentaciones de cacao. Fuente [7]

Brazil ²⁹	Ghana ³²	Malaysia ³²	Belize ¹⁰⁰
<i>Lactobacillus Acidophilus, Lb. brevis, Lb. casei, Lb. Delbrueckii, Lb. fermentum</i>	<i>Lb. collinoides</i> <i>Lb. fermentum</i>	<i>Lb. collinoides,</i> <i>Lb. plantarum</i>	<i>Lb. brevis, Lb. buchneri, Lb. casei, Lb. Casei pseudoplatarum, Lb. cellobiosus, Lb. delbrueckii,</i>
<i>Lb. Lactis, Lb. Plantarum</i>	<i>Lb. mali</i>		<i>Lb. fermentum, Lb. fructivorans, Lb. gasseri, Lb. kandleri, Lb. plantarum, Leuconostoc</i>
<i>Lactococcus lactis, Leuconostoc mesenteroides, Pediococcus acidilactici, P. dextrinicus</i>	<i>Lb. plantarum</i>		<i>mesenteroides, Ln. oenos, Ln. paramesenteroides</i>

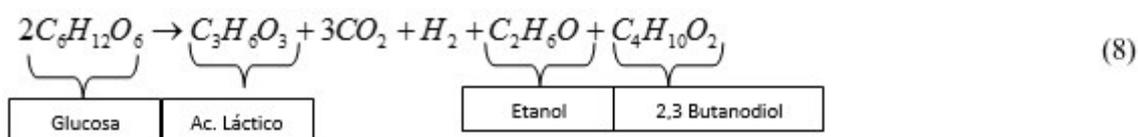
Las bacterias acéticas (ver Tabla A2) descomponen alcoholes, disminuyendo el contenido de estos en la masa fermentativa, lo que a veces puede ser perjudicial en algunas fermentaciones de licores, como la malta. En la Ecuación (7) se aprecia la formación de ácido acético y agua a partir de etanol, la cual tiene una serie de pasos intermedios (deshidrogenación del etanol a acetaldehído, formación de hidratos, entre otros) [13], lo que indica que la cinética que esta ecuación probablemente no sea elemental. La Ecuación (7) es exotérmica (puede elevar la temperatura hasta 50°C [7]) y representa un aporte importante a la acidez del cacao [7], otra bibliografía indica que el ácido más importante es el ácido láctico ya que da lugar a valores de pH inferiores [14]. Otras fuentes bibliográficas [18] indican que el etanol se descompone en ácido acético y acetato etílico. Durante la fase aeróbica, el *Acetobacter pasteurianus* era la especie de bacteria acética predominante durante la fermentación, oxidando el etanol producido por las levaduras en ácido acético [16].



Tabla A3: Principales especies de bacterias acéticas aisladas de distintas fermentaciones de cacao. Fuente [7]

Brazil ³¹	Ghana ³²	Malaysia ³²	Belize ¹⁰⁰
<i>Acetobacter acetii</i> subsp. <i>liquefaciens</i> , <i>A. pasteurianus</i> , <i>A. peroxydans</i> , <i>Gluconobacter oxydans</i> subsp. <i>suboxydans</i>	<i>Acetobacter ascendens</i> , <i>A. rancens</i> , <i>A. xylinum</i> , <i>Gluconobacter oxydans</i>	<i>Acetobacter lovaniensis</i> , <i>A. rancens</i> , <i>A. xylinum</i> , <i>Gluconobacter oxydans</i>	<i>Acetobacter</i> spp., <i>Gluconobacter oxydans</i>

Las bacterias formadoras de esporas aerobias se forman en presencia de oxígeno (fase aerobia) y durante los últimos días de la fermentación. Pueden ser los bacilos: *B.stearothermophilus*, *B.coagulans* y la *B.circulans*, o las aeromonas. Durante la fermentación pueden formar una variedad de compuestos volátiles (Ecuación (8)) como ácido acético y láctico, 2-3 Butanodiol, pirazinas, entre otros. Los cuales deterioran el sabor del chocolate [16].



Finalmente, también el ácido láctico es descompuesto en agua y dióxido de carbono, como resultado del proceso fermentativo.



En la siguiente tabla se muestran los valores de las entalpías de formación y capacidad calorífica de compuestos relacionados a la fermentación de cacao.

Tabla A4 Capacidades Caloríficas de principales compuestos químicos de la fermentación

	Entalpía de formación H°(kJ/mol)	Capacidad calorífica molar a presión constante en 298.15K Cp(J/mol K)	Masa molar (g/mol)
C_2O	-393.5	37.1	44.0095
Ácido Acético	-484.3	123.3	60.052
Acido Fórmico	-425	99	46.02538
Etanol	-277.6	112.3	46.06844
Ácido láctico	-675.21	127.67	98.08
H_2O	-285.8	75.3	18.01528
$C_6H_{12}O_6$	-1271.5	218.96	180.1559

Ácido Cítrico	-1543.8		192.124
Manitol	-1314.5		182.172
Sacarosa	-2226.1		342.2965
Oxígeno	0	29.4	-32

Anexo 3: Código de simulación de un modelo paramétrico en plataforma ECOSIMPRO

A3.1. Código del modelo matemático del biorreactor:

COMPONENT BioModel

DATA

REAL k1=1.9608

REAL k2=1.0027

REAL k3=3.33

REAL k4=1.6667

REAL k5=0.8523

REAL k6=10

REAL k7=1.6667

REAL k8=2.95--1.111

REAL k9=0.593

REAL k10=3.33

REAL k11=3.33

REAL k12=7.55

REAL k13=4.5--9.8

REAL kd1=0.005

REAL kd2=0.01

REAL kd3=0.03

- REAL cm1=0.0046 --descomposicion del etanol
- REAL cm2=0.1843 --descomposicion del acido lactico
- REAL umax1=0.42
- REAL umax2=0.34
- REAL umax3=0.1

REAL ks1 = 0.405194--0.000154612

REAL ks2 = 0.405194--0.343493

REAL ks3 = 10.5436--2.28715

REAL ks4 = 7.25--1.5--0.07

- REAL ksi1 = 123.52

REAL ksi2 = 125.57532

REAL ksi3 = 3.52

REAL ksi4 = 325--401.5

DECLS

REAL

Glucosa,Fructuosa,Etanol,ALactico,AAcetico,SCerevisiae,LPlantarum,APasterianus,r
1,r2,r3,r4,umax1,Ts,umax2,umax3

CONTINUOUS

Ts=40--30+15*sin(0.25*TIME)

umax1 = ZONE (Ts>=15 AND Ts<=55) -0.0003*Ts**2+0.034*Ts-0.4103

OTHERS 0.01

umax2=ZONE (Ts>=28.5 AND Ts<=47)-9.5086+0.5368*Ts-0.0071*Ts**2

OTHERS 0.01

umax3=ZONE (Ts>=24 AND Ts<=47) -1.5739+0.0996*Ts-0.0014*Ts**2

OTHERS 0.01

--r1=umax1*(Glucosa/(ks1+Glucosa+Glucosa**2/ksi1))*SCerevisae

r1=umax1*(Glucosa/(ks1+Glucosa))*SCerevisae

r2=umax2*(Fructuosa/(ks2+Fructuosa+Fructuosa**2/ksi2))*LPlantarum

--r2=umax2*(Fructuosa/(ks2+Fructuosa))*LPlantarum

r3=umax2*(Glucosa/(ks3+Glucosa+Glucosa**2/ksi3))*LPlantarum

--r3=umax2*(Glucosa/(ks3+Glucosa))*LPlantarum

r4=umax3*(Etanol/(ks4+Etanol+Etanol**2/ksi4))*APasterianus

--r4=umax3*(Etanol/(ks4+Etanol))*APasterianus

--sacarosa'=-k1*sacarosa

kr2*Glucosa=-k1*r1-k10*r3--k1*sacarosa-k2*glucosa

3*kr4*Fructuosa-kr5*Fructuosa=-k3*r2-k6*r2--k1*sacarosa-3*k4*fructosa-
k5*fructosa

- kr4*Fructuosa+kr5*Fructuosa-
kr9*ALactico/(ALactico+cm2)=r2*k4+r3*k11+k7*r2--k6*citrico-
k9*lactico/(lactico+cm2)
- kr5*Fructuosa+kr7*Etanol/(Etanol+cm1)=k13*r4+k8*r2--
k6*citrico+k7*etanol/(etanol+cm1)
- citrico'=-k6*citrico
- 2*kr2*Glucosa+kr5*Fructuosa-kr7*Etanol/(Etanol+cm1)=r1*k2+r2*k5-r4*k12

Glucosa'=-k1*r1-k10*r3

Fructuosa'=-k3*r2-k6*r2

Etanol'=r1*k2+r2*k5-r4*k12

ALactico'=r2*k4+r3*k11+k7*r2

AAcetico'=k13*r4+k8*r2

SCerevisae'=r1-kd1*SCerevisae

LPlantarum'=2*r2+r3-kd2*LPlantarum

APasterianus'=r4-kd3*APasterianus

END COMPONENT

Código del experimento:

EXPERIMENT exp1 ON BioModel.default

DECLS

OBJECTS

INIT

- initial values for state variables

Glucosa = 142.4

```

Fructuosa = 162.5
Etanol = 0
ALactico = 0
AAcetico = 0
SCerevisae = 0.0016
LPlantarum = 0.0013
APasterianus = 3.782e-004
Glucosa'=0
Fructuosa'=0
Etanol'=0
ALactico'=0
AAcetico'=0
SCerevisae'=0
LPlantarum'=0
APasterianus'=0
BOUNDS
BODY

```

- report results in file reportAll.rpt

```
REPORT_TABLE("reportAll.rpt", "**")
```

- Set the tolerances (relative and absolute);

```
REL_ERROR = 1e-006
ABS_ERROR = 1e-006
```

- Integrate the model

```

TIME = 0
TSTOP = 150
CINT = 0.1
INTEG()
END EXPERIMENT

```

A3.2. Código incluyendo la dependencia de temperatura en Ecosimpro

```
COMPONENT BioModel
```

```
DATA
```

```

REAL k1=1.9608
REAL k2=1.0027
REAL k3=3.33
REAL k4=1.6667
REAL k5=0.8523
REAL k6=10
REAL k7=1.6667
REAL k8=1.111
REAL k9=0.593
REAL k10=3.33
REAL k11=3.33
REAL k12=7.55
REAL k13=9.8

```

REAL cm1=0.0046 --descomposicion del etanol
 REAL cm2=0.1843 --descomposicion del acido lactico

- REAL umax1=0.42
- REAL umax2=0.34

REAL umax3=0.1
 REAL ks1 = 5.67312--0.000154612
 REAL ks2 = 0.405194--0.343493
 REAL ks3 = 10.5436--2.28715
 REAL ks4 = 1.5--0.07

- REAL ksi1 = 23.52
- REAL ksi2 = 4.57532

REAL ksi3 = 3.52

- REAL ksi4 = 0.12

DECLS

REAL

Glucosa,Fructuosa,Etanol,ALactico,AAcetico,SCerevisae,LPlantarum,APasterian
 us,r1,r2,r3,r4,umax1,Ts,umax2

REAL kr2,kr4,kr5,kr9,kr7

CONTINUOUS

Ts=30+15*sin(0.25*TIME)

umax1 = ZONE (Ts>=15 AND Ts<=55) -0.0003*Ts**2+0.034*Ts-0.4103

OTHERS 0.1

umax2=ZONE (Ts>=28.5 AND Ts<=47)-9.5086+0.5368*Ts-0.0071*Ts**2

OTHERS 0.1

- $r1=umax1*(Glucosa/(ks1+Glucosa+Glucosa**2/ksi1))*SCerevisae$

$r1=umax1*(Glucosa/(ks1+Glucosa))*SCerevisae$

- $r2=umax2*(Fructuosa/(ks2+Fructuosa+Fructuosa**2/ksi2))*LPlantarum$

$r2=umax2*(Fructuosa/(ks2+Fructuosa))*LPlantarum$

$r3=umax2*(Glucosa/(ks3+Glucosa+Glucosa**2/ksi3))*LPlantarum$

- $r3=umax2*(Glucosa/(ks3+Glucosa))*LPlantarum$
- $r4=umax3*(Etanol/(ks4+Etanol+Etanol**2/ksi4))*APasterianus$

$r4=umax3*(Etanol/(ks4+Etanol))*APasterianus$

- $sacarosa'=-k1*sacarosa$
- $kr2*Glucosa=-k1*r1-k10*r3--k1*sacarosa-k2*glucosa$
- $3*kr4*Fructuosa-kr5*Fructuosa=-k3*r2-k6*r2--k1*sacarosa-3*k4*fructosa-k5*fructosa$

```

kr4*Fructuosa+kr5*Fructuosa-
kr9*ALactico/(ALactico+cm2)=r2*k4+r3*k11+k7*r2--k6*citrico-
k9*lactico/(lactico+cm2)
kr5*Fructuosa+kr7*Etanol/(Etanol+cm1)=k13*r4+k8*r2--
k6*citrico+k7*etanol/(etanol+cm1)

```

- citrico'=-k6*citrico

```

2*kr2*Glucosa+kr5*Fructuosa-kr7*Etanol/(Etanol+cm1)=r1*k2+r2*k5-r4*k12
Glucosa'=-k1*r1-k10*r3
Fructuosa'=-k3*r2-k6*r2
Etanol'=r1*k2+r2*k5-r4*k12
ALactico'=r2*k4+r3*k11+k7*r2
AAcetico'=k13*r4+k8*r2
SCerevisae'=r1
LPlantarum'=2*r2+r3
APasterianus'=r4
END COMPONENT

```

Experimento de segunda versión del modelo

```

EXPERIMENT exp1 ON BioModel.default
DECLS
OBJECTS
INIT

```

- initial values for state variables

```

Glucosa = 142.4
Fructuosa = 162.5
Etanol = 0
ALactico = 0
AAcetico = 0
SCerevisae = 0.0016
LPlantarum = 0.0013
APasterianus = 3.782e-004
Glucosa'=0
Fructuosa'=0
Etanol'=0
ALactico'=0
AAcetico'=0
SCerevisae'=0
LPlantarum'=0
APasterianus'=0
BOUNDS
BODY

```

- report results in file reportAll.rpt

```

REPORT_TABLE("reportAll.rpt", "**")

```

- Set the tolerances (relative and absolute);

```
REL_ERROR = 1e-006
```

```
ABS_ERROR = 1e-006
```

- Integrate the model

```
TIME = 0
```

```
TSTOP = 150
```

```
CINT = 0.1
```

```
INTEG()
```

```
END EXPERIMENT
```

Anexo 4: Código de programación de S-Function.

A4.1. Programación de Derivadas Continuas.

```

float r1,r2,r3,r4;
float umax1,umax2,umax3;
float k1=1.9608;
float k2=0.3;//0.485;//1.0027
float k3=3.33;
float k4=0.867;//1.6667;
float k5=3.2523;//2.2523;//0.8523
float k6=10;
float k7=1.6667;
float k8=2.95;//2.95 - 1.111;
float k9=0.593;
float k10=3.33;
float k11=1.24;//3.33;
float k12=9.55;//7.55
float k13=6.84;//2.84 - 9.8;
float kd1=0.005;
float kd2=0.43;//0.01;
float kd3=0.03;
float kdL=0.02; // Decomposition Rate Acid Lactic.
float kdE=0.008;

if ((u0[0]>=15)&&(u0[0]<=55)){
    umax1 = -0.0003*pow(u0[0],2)+0.034*u0[0]-0.4103;
}
else{
    umax1=0.01;
}
if ((u0[0]>=28.5)&&(u0[0]<=47)){
    umax2 = -9.5086+0.5368*u0[0]-0.0071*pow(u0[0],2);
}
else{
    umax2=0.01;
}
if ((u0[0]>=24)&&(u0[0]<=47)){
    umax3 = -1.5739+0.0996*u0[0]-0.0014*pow(u0[0],2);
}
else{
    umax3=0.01;
}

```

```

}

r1=umax1*(xC[0]/(ks1[0]+xC[0]))*xC[5];
r2=umax2*(xC[1]/(ks2[0]+xC[1]+pow(xC[0],2)/ksi2[0]))*xC[6];//umax2*(xC[1]/(ks2[
0]+xC[1]))*xC[6];
r3=umax2*(xC[0]/(ks3[0]+xC[0]+pow(xC[0],2)/ksi3[0]))*xC[6];
r4=umax3*(xC[2]/(ks4[0]+xC[2]+pow(xC[2],2)/ksi4[0]))*xC[7];
if (xC[0]<0){

    dx[0]=0;
    xC[0]=0;

}else{

    dx[0]=-k1*r1-k10*r3;
}
if (xC[1]<0){

    dx[1]=0;
    xC[1]=0;

}else{

    dx[1]=-k3*r2-k6*r2;
}
if (xC[2]<0){

    dx[2]=0;
    xC[2]=0;

}else{

    dx[2]=r1*k2+r2*k5-r4*k12-xC[2]*kdE;
}
if (xC[3]<0){

    dx[3]=0;
    xC[3]=0;

}else{

    dx[3]=r2*k4+r3*k11+k7*r2-kdL*xC[3];
}
if (xC[4]<0){

    dx[4]=0;
    xC[4]=0;

}else{

    dx[4]=k13*r4+k8*r2;
}
if (xC[5]<0){

```

```

    dx[5]=0;
    xC[5]=0;

}else{
    dx[5]=r1-kd1*xC[5];
}
if (xC[6]<0){
    dx[6]=0;
    xC[6]=0;

}else{
    dx[6]=2*r2+r3-kd2*xC[6];
}
if (xC[7]<0){
    dx[7]=0;
    xC[7]=0;

}else{
    dx[7]=r4-kd3*xC[7];
}

```

A4.2. Programación de salidas del modelo.

```

float umax1;
float umax2;
float umax3;

```

```

if ((u0[0]>=15)&&(u0[0]<=55)){
    umax1 = -0.0003*pow(u0[0],2)+0.034*u0[0]-0.4103;
}else{
    umax1=0.01;
}

if ((u0[0]>=24)&&(u0[0]<=47)){
    umax3 = -1.5739+0.0996*u0[0]-0.0014*pow(u0[0],2);
}else{
    umax3=0.01;
}

```

```
if ((u0[0]>=28.5)&&(u0[0]<=47)){  
    umax2 = -9.5086+0.5368*u0[0]-0.0071*pow(u0[0],2);  
}else{  
    umax2=0.01;  
}  
  
y0[0]=xC[0];  
y0[1]=xC[1];  
y0[2]=xC[2];  
y0[3]=xC[3];  
y0[4]=xC[4];  
y0[5]=xC[5];  
y0[6]=xC[6];  
y0[7]=xC[7];  
r[0]=umax1*(xC[0]/(ks1[0]+xC[0]))*xC[5];  
r[1]=umax2*(xC[1]/(ks2[0]+xC[1]+pow(xC[0],2)/ksi2[0]))*xC[6];  
r[2]=umax2*(xC[0]/(ks3[0]+xC[0]+pow(xC[0],2)/ksi3[0]))*xC[6];  
r[3]=umax3*(xC[2]/(ks4[0]+xC[2]+pow(xC[2],2)/ksi4[0]))*xC[7];
```