

DISEÑO DE UN BIORREACTOR PARA LA OBTENCIÓN DE ÁCIDO ACÉTICO A PARTIR DEL VINO DE MUCÍLAGO DE CACAO (*THEOBROMA CACAO L.*)

BIOREACTOR DESIGN FOR OBTAINING ACETIC ACID FROM WINE OF COCOA MUCILAGE (*THEOBROMA CACAO L.*)

Palacios-Vallejos Karla¹; Álcivar-Álcivar Lady¹; Pico Cresencio¹; Posligua-Laz Gema¹; Romero-Mendoza María¹; Rosero-Delgado Ernesto^{1*}

¹Universidad Técnica de Manabí, Departamento de Procesos Químicos, Portoviejo, Ecuador

*Correo: erosero@utm.edu.ec

Resumen

Mediante el presente trabajo se evaluó la obtención de ácido acético a partir del vino del mucílago de cacao, para lo cual se puso en marcha un biorreactor a pequeña escala. Se empleó como sustrato el vino del mucílago de cacao nacional, a través de una fermentación sumergida con un inóculo del cultivo madre de vinagre. El vinagre se obtuvo mediante una fermentación oxidativa del alcohol presente en el vino. Se realizó la caracterización inicial del sustrato (%Alcohol= 18% (v/v), pH=5,2 y acidez=8,1 g/L), estableciendo las condiciones óptimas para una fermentación acética. Se suministró 1,5 L/min de O₂ durante 3 horas al día, evaluando el efecto sobre la producción de ácido acético (g/L) durante 12 días. La mayor producción de ácido acético fue 18,37 g/L, teniendo un rendimiento de 9 % en la producción de ácido, mientras que se obtuvo un rendimiento del 59% en la producción de biomasa. Se concluyó que la fermentación acética del vino del mucílago del cacao, con un flujo de oxígeno de 1,5 L/min durante 3 horas al día, produce un bajo rendimiento de ácido acético.

Palabras clave: Ácido acético; fermentación; mucílago; *Theobroma Cacao L.*

Abstract

The present work investigated the feasibility of obtaining acetic acid from the cocoa mucilage wine, which consisted of developing a small-scale acetifier, starting from the national cocoa mucilage wine as a substrate through a submerged fermentation and using as inoculum culture "mother of vinegar". The vinegar was obtained by an oxidative fermentation of the alcohol present in the wine. The initial characteristics of the substrate were characterized (% Alcohol = 18% (v / v) pH = 5.2 acidity = 8.1 g / L), establishing the optimal conditions for acetic fermentation. 1.5 L / min of O₂ was supplied for 3 hours a day, evaluating the effect on the production of acetic acid (g / L) for 12 days. The highest production of acetic acid 18.37 g / L, having a yield of 9% in the production of acid while obtaining a yield of 59% in the production of biomass. It was concluded that the acetic fermentation given to cocoa mucilage wine with an O₂ exposure time of 1.5 L / min for 3 hours a day, produces a low yield of acetic acid.

Keywords: Acetic acid; fermentation; mucilage; *Theobroma Cacao L.*

1. Introducción

El ácido acético o ácido metilcarboxílico, es una sustancia orgánica presente en la composición del vinagre, responsable de su típico olor y sabor agrio. Según la IUPAC, su fórmula es $\text{CH}_3\text{-COOH}$ ($\text{C}_2\text{H}_4\text{O}_2$) (Arteaga, 2013). Se lo emplea con fines domésticos como la cocina, limpiador, aderezo y en proyectos de índole científico (Ortiz & Álvarez, 2015). En 1895 Louis Pasteur descubrió el proceso de fermentación acética por bacterias, para pasteurizar a los organismos contaminantes sin interferir en la calidad del vino. Con el pasar de los años se implementan nuevas técnicas y pruebas donde se llegó a la conclusión de dos procesos: por síntesis o fermentación bacteriana (Delgado, 2018).

Existen distintos métodos para la elaboración de vinagre, el método Schützenbach fue el primer paso para transformar el método artesanal (Orleans) en el primer proceso industrial, este método aumentó la velocidad de acetificación incrementando la superficie de contacto de las bacterias ácido-lácticas con el oxígeno. Actualmente, el más utilizado es el sistema de cultivo sumergido, en el que las *acetobacter* se sumergen en la solución que contiene el sustrato, con la

finalidad de obtener vinagre con un elevado grado acético en periodos muy cortos (24h) (Sarabia & Rodríguez, 2012). Otro proceso, es el método de superficie donde los microorganismos productores de ácido acético se encuentran en la capa superficial del mosto, para formar una película de celulosa “madre del vinagre” (Romo, 2011).

El proceso de fermentación acética consiste en la oxidación bioquímica del etanol contenido en un sustrato alcohólico, para la formación de ácido acético. Es decir, la oxidación del etanol se da por todos los géneros de bacterias ácido-lácticas, presentando dos reacciones catalíticas secuenciales que permiten la formación de ácido acético y agua. El etanol es transformado en acetaldehído por la enzima *alcohol deshidrogenasa* (ADH) y posteriormente el acetaldehído es oxidado a ácido acético por acción de la enzima *aldehído deshidrogenasa* (ALDH); ambas localizadas en la membrana citoplasmática y orientadas hacia el espacio piroplasmático. Estos dos complejos enzimáticos están conectados con la cadena respiratoria que, por medio de la ubiquinona, transfiere los electrones disponibles hasta el oxígeno,

que actúa como un aceptador final (Muñoz, 1997).

El exudado del mucílago de cacao (*Theobroma Cacao L.*) es una sustancia viscosa, generalmente hialina. La fruta del cacao contiene de 30 a 50 semillas o almendras. El número, tamaño y forma de la semilla es una característica varietal, de modo que las semillas son cuerpos aplanados elipsoidales de 2 a 4 cm de largo, rodeadas por una envoltura blancuzca y azucarada; además, están compuestas principalmente por parénquima.

La pulpa hidrolizada es conocida en la industria como "exudado". Durante la fermentación, la pulpa provee el sustrato para varios microorganismos que son esenciales para el desarrollo de los precursores del sabor del chocolate, los cuales son expresados completamente después, durante el proceso de tostado. Aunque la pulpa es necesaria para la fermentación, a menudo hay más pulpa de la necesaria. La pulpa mucilaginosa está compuesta por células esponjosas parenquimatosas, que contiene células de savia ricas en azúcares (10-13%), pentosas (2-3%), ácido cítrico (1-2%), y sales (8-10%). Por lo tanto, la pulpa que se caracteriza por un agradable sabor

tropical, ha sido usada con los siguientes fines productivos: jalea de cacao, alcohol, vinagre, nata y pulpa procesada (Téllez & Cote, 2006). Mediante la hidrólisis natural de la pulpa durante la poscosecha, se pueden obtener alrededor de 40 litros de exudado por cada 800 kg de pulpa húmeda. En la tabla 1 se muestra la composición química del mucílago de cacao.

Tabla 1. Composición porcentual p/p del mucílago de cacao en base húmeda.

Componentes	% p/p
Agua	79,2-84,2
Proteínas	0,09-0,11
Azúcares	12,50-15,9
Glucosa	11,6-15,32
Pectinas	0,9-1,19
Ácido cítrico	0,77-1,52
Cenizas	0,40-0,50

Fuente: (Ortiz & Álvarez, 2015).

Los objetivos de la presente investigación fueron demostrar la viabilidad del aprovechamiento del exudado de mucílago del cacao en la elaboración de ácido acético, además, determinar los rendimientos tanto teóricos como experimentales en biomasa y producto, y diseñar un reactor para producción a escala piloto.

2. Materiales y métodos

El proceso se llevó a cabo a partir de vino del mucílago de cacao (sustrato),

mediante la fermentación aerobia del vino se obtuvo como producto principal ácido acético (vinagre).

2.1. Inóculo

El cultivo madre que fue utilizado como inóculo, se obtuvo por el método Orleans; según Llaguno & Polo (1991) las bacterias acéticas (aerobios estrictos) se encuentran en la superficie del vino, debido a que oxidan el alcohol etílico a ácido acético y forman una biopelícula de celulosa denominada “madre del vinagre”.

Se realizó un picado espontáneo vertido en el vino, en un recipiente con una elevada área superficial para el contacto con O₂, cubierto con gasas para evitar la contaminación física del cultivo por 5 días.

2.2. Condiciones experimentales

El proceso experimental se realizó mediante fermentación sumergida en un biorreactor que fue construido en un envase de plástico de 1,5 litros (L) con tres orificios, para toma de muestra, entrada de O₂ y trampa de CO₂.

Se utilizaron 800 ml de vino y se adaptó el medio según los requerimientos físicos, químicos y nutritivos del microorganismo a utilizar, añadiendo 0,15 gramos de sulfato de amonio como fuente de nitrógeno. Se controló de la

mejor manera la temperatura del proceso para evitar que baje del rango mínimo de crecimiento de la acetobacter. El rango óptimo para el desarrollo de la fermentación aerobia es 28 – 32 °C (Llaguno & Polo, 1991).

Se monitoreó la acidez y los grados de alcohol a diario durante 6 días.

Las condiciones de operación que se manejaron en el biorreactor fueron:

Temperatura: 30 °C.

pH inicial de 5,4 – 6,3.

Grado alcohólico: 5-18 ° GL.

Se realizó la medición de pH utilizando tiras de coloración. Por su parte, la medición del porcentaje de alcohol se realizó mediante el refractómetro.

2.3. Determinación de acidez

Se midieron con exactitud 10 ml de muestra y se transfirieron a un matraz de 100ml; para posteriormente enrasar un volumen de 100 ml con agua destilada libre de CO₂.

De la dilución realizada, se tomó una alícuota de 10 ml, que fue ubicada en una fiola de 300 ml, junto con 75 ml de agua destilada libre de CO₂ y tres gotas de fenolftaleína.

La titulación se realizó agregando la solución de NaOH desde la bureta hasta el primer tono de color rosado que persista.

Finalmente, se reportó el consumo, para determinar el porcentaje de ácido acético usando la formula general de porcentaje volumétrico.

$$\text{Acidez} = m.e. * mL * N / V \quad \text{Ec. \#1}$$

Donde:

Acidez: acidez de la muestra, g/L.

m.e.: miliequivalente del ácido acético.

ml: volumen empleado en la titulación, ml.

N: Normalidad de la solución de NaOH.

V: volumen de la muestra, L.

2.4. Determinación de Biomasa (Peso seco)

Se pesó el papel filtro (W1), la muestra se filtra y se secó en el horno a 105°C durante 4 horas. Para concluir se pesó el papel filtro con la muestra seca (W2).

Finalmente, el peso de la biomasa corresponde a la diferencia entre W2 y W1.

3. Resultados y Discusión

3.1. Parámetros iniciales

En la Tabla 2 se presentan los parámetros iniciales en el proceso de fermentación acética.

La determinación de pH, contenido de alcohol y concentración de acidez del medio de fermentación se realizó cada

24 horas, obteniendo los resultados que se indican a continuación.

Tabla 2. Parámetros iniciales en el proceso de fermentación acética.

Parámetro	Cantidad	Unidad
Volumen de mosto	800	ml
Contenido de alcohol	18	% v/v
pH	5,2	-
Acidez	8,1	g/L

3.2. pH

Se obtuvo una disminución del pH a través del tiempo, pasando de 5,2 a 3; esta disminución se observa en la gráfica 1, con una tendencia descendente, que luego se mantiene constante y vuelve a descender hasta llegar a la medida final. En concordancia, el paso de los días y la materia prima como tal tienen un efecto significativo en el cambio del pH. Sarabia y Rodríguez (2012), en un experimento similar reportaron valores en la reducción de pH desde aproximadamente 3,4 a 2,9. Debido a que el vinagre puede obtenerse de diversas fuentes, su pH adecuado u óptimo puede variar en dependencia de aquello, así lo demuestra la literatura. Entre los requerimientos de calidad que debe cumplir el vinagre, se encuentra un pH de 2 a 2,5 (INEN 2296: 2003).

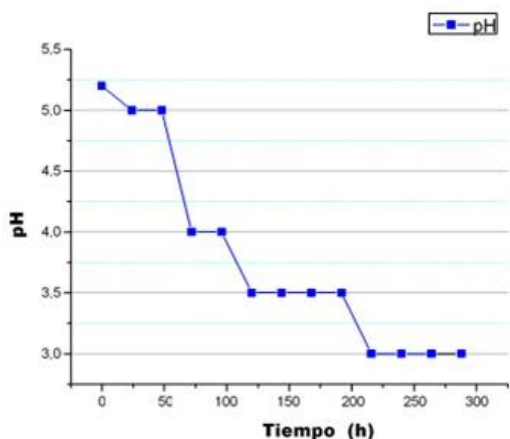


Figura 1. Curva de pH.

3.3. Contenido de alcohol

Durante el proceso también se evidenció un comportamiento descendiente en el contenido de alcohol; este comportamiento se muestra en la figura 2, en donde se evidencia la reducción del etanol en el proceso de fermentación, por efecto de la oxidación del alcohol a ácido acético durante los 12 días de fermentación.

Romo (2011) menciona que los microorganismos fermentadores son de vital importancia en este proceso, debido a que consumen el sustrato (etanol), afectando directamente la velocidad de fermentación y cantidad de biomasa. Por lo tanto, los microorganismos *acetobacter* son los responsables de la disminución del contenido de alcohol y aumento de la concentración de ácido acético.

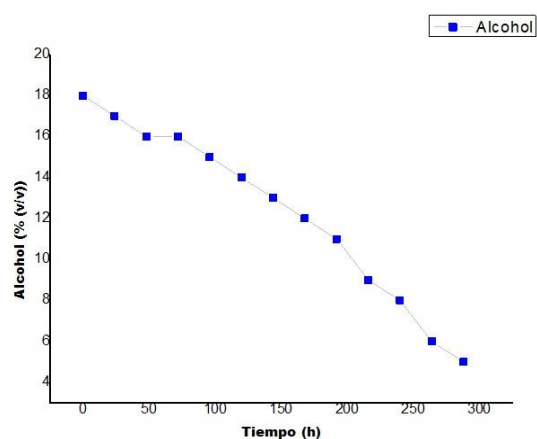


Figura 2. Cinética de consumo de sustrato durante la fermentación.

3.4. Acidez

En la gráfica 3, se muestra la producción de ácido acético. Se observa, que el proceso se puso en marcha con una concentración de 8,1 g/L de ácido acético y se presenta un comportamiento ascendente hasta alcanzar una concentración de 18,37 g/L, en donde según a la norma Codex Stan 162-1987 (FAO, 1987), el contenido total de ácido obtenido de un vino debe ser como mínimo 60 g/L (ácido acético).

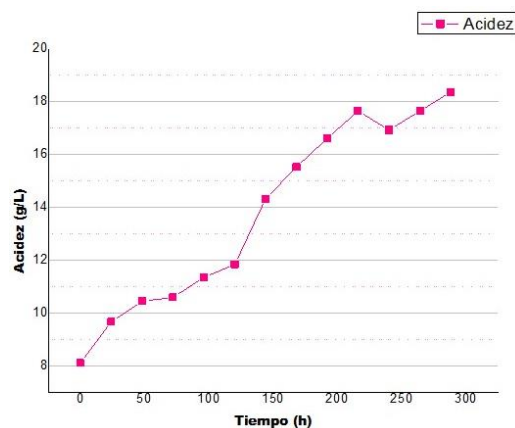


Figura 3. Cinética de la producción de ácido acético.

3.5. Coeficientes estequiométricos

En la Tabla 3, se presentan los resultados obtenidos para el correcto ajuste de la

ecuación estequiométrica, que bajo condiciones teóricas considera los siguientes compuestos químicos:

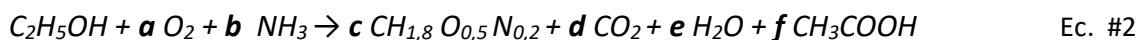


Tabla 3. Coeficientes estequiométricos de los compuestos presentes en la reacción química.

Coeficientes estequiométricos	Mol (moles)	Masa (gramos)
a	0,9496	0,6596
b	0,3381	0,1250
c	1,6909	0,9029
d	0,0341	0,0326
e	1,7105	0,6683
f	0,1374	0,1791

3.6. Rendimiento de reacción

En la Tabla 4, se presentan los valores obtenidos para los rendimientos teóricos y reales de la biomasa y del producto principal (ácido acético) del proceso. El rendimiento porcentual relaciona el rendimiento experimental respecto al rendimiento teórico.

Tabla 4. Rendimientos reales y teóricos de biomasa y ácido acético.

Rendimiento	Biomasa	Ácido acético
Experimental (g/g)	0,9029	0,1791
Teórico (g/g)	1,5256	1,9552
% Rendimiento	59,18	9,16

Los resultados obtenidos demuestran una baja producción de ácido acético, en contraste con el experimento

desarrollado por Ferreyra et al. (2012), en el que se menciona que para la fermentación acética de naranja (*Citrus sinensis* var. W. Navel) mediante *Acetobacter sp.*, el rendimiento global del proceso en función de la producción de vinagre fue de 46 g/L. Por lo que convendría mencionar que los microorganismos no aprovecharon los componentes del medio para transformarlo en ácido acético y de esta forma, obtener mayor contenido de producto, pero su presencia en el medio es notable. Según Muñoz (1997), en los procesos biotecnológicos, la obtención del producto es consecuencia de la actividad de los microorganismos, por lo que la generación de biomasa es un

comportamiento natural. Además, se menciona que factores como la agitación y proporción de carga combinada vinagre/alcohol, potencian el rendimiento de vinagre en procesos fermentativos.

El consumo de sustrato que no genera mayores réditos en cuanto a la producción, se lo asocia con el mantenimiento de las funciones vitales de los microorganismos, aunque existen otros factores que pueden influir en el bajo rendimiento del producto, como una pobre concentración de biomasa o incluso la inhibición del inóculo, debido a

que Yoneda et al., (2001), indican que la alimentación de etanol a elevadas concentraciones implica un bajo rendimiento del proceso, lo que propicia un efecto inhibitorio del etanol sobre la biomasa.

3.7. Balance de materiales

En la Tabla 5, se muestran los valores obtenidos en el balance de materia realizado para cada uno de los componentes que intervienen en el proceso de producción de ácido acético, según la ecuación estequiométrica (Ecuación 2).

Tabla 5. Resultados del balance de materia para cada componente de la reacción química.

Compuesto	Entrada (g)	Consumo (g)	Generación (g)	Salida (g)
C ₂ H ₅ OH	113,62	82,06	-	31,56
O ₂	940,65	0,659	-	939,99
N ₂	3028,35	-	-	3028,35
NH ₃	0,15	0,125	-	0,025
CH _{1,8} O _{0,5} N _{0,2}	-	-	0,903	0,902
CO ₂	-	-	0,033	0,033
H ₂ O	656	-	0,668	656,67
CH ₃ COOH	-	-	0,179	0,179
Total	4738,77	82,84	1,78	4657,71

Para el balance general de materia, se obtuvieron los valores de 4740,55 en la entrada del sistema y en la salida 4740,55 gramos, respectivamente; los mismos que obedecen a la ley de la conservación de la materia, en la que se

menciona que la materia no se crea ni se destruye, solo se transforma.

3.8. Diseño de biorreactor

Además, en esta investigación se realizó un escalamiento piloto teórico y el

diseño de un reactor para una producción de 50 litros de ácido acético. Los datos obtenidos se muestran en la Tabla 6; de la misma forma en la gráfica 4 el prototipo de un reactor de lote convencional.

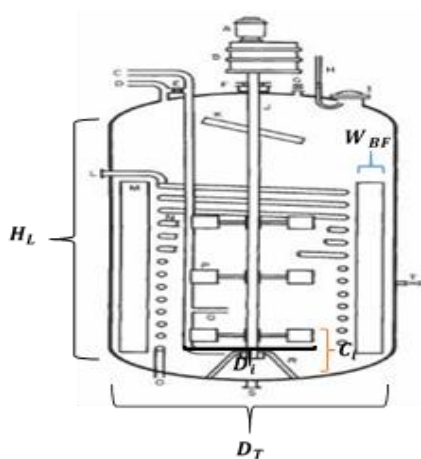


Figura 4. Reactor de lote convencional.

A partir de los datos obtenidos se estableció que el flujo de operación se caracteriza por un régimen turbulento y para lograr la homogenización del caldo fermentativo en la producción de 50 litros de ácido acético, es necesario un tiempo de mezcla de aproximadamente 4,71 segundos con una potencia de 1,87 Watts y una velocidad de agitación de 3,33 Hertz (200 rpm). También, se realizó el cálculo para conocer la efectividad del impulsor y la dispersión del flujo de gas en el medio fermentativo, concluyendo que el gas se dispersaría completamente en el medio

debido a que el flujo que puede dispersar el impulsor es de 27,48 L/min.

Tabla 6. Parámetros de diseño de un biorreactor para la producción de 50 litros de ácido acético.

Parámetro	
Diámetro del tanque (D_T)	0,52 metros
Diámetro de impelente (D_i)	0,17 metros
Velocidad de agitación (N_i)	3,33 Hertz
Densidad del caldo	789 g/L
Viscosidad del caldo	1,25 kg / m*s
Altura del líquido (H_L)	0,52 metros
Deflectores (W_{BF})	0,052 metros
Espacio libre inferior (C_i)	0,17 metros
Número de Reynolds (Re_i)	60744,79
Potencia del agitado (P)	1,87 Watts
Tiempo de mezcla (t_m)	4,71 s
Número de flujo gaseado	0,028
Flujo de gas	27,48 L/min

Para comprobar dichos resultados es necesario realizar experimentos que determinen si tanto el reactor diseñado, la velocidad de agitación y potencia requerida influyen en el proceso fermentativo, teniendo en cuenta el crecimiento microbiano, necesidad de refrigeración, formación de burbujas, canalizaciones, y cualquier otro factor que pueda afectar el rendimiento del proceso biológico.

Conclusiones

Por lo expuesto en el desarrollo del artículo, las altas concentraciones de etanol ejercen una función inhibidora y provocan la aparición de reacciones secundarias, a pesar de esto se evidenciaron resultados aceptables en cuanto a la generación de ácido acético y sus características.

El diseño del reactor incluye los requerimientos necesarios para que el proceso de fermentación se lleve a cabo bajo condiciones óptimas de operación.

A partir del diseño de reactor propuesto, se recomienda realizar investigaciones que permitan comprobar la eficiencia productiva y de esta forma promover la optimización del proceso fermentativo del mucílago de cacao en la obtención de ácido acético.

Bibliografía

Arteaga-Estrella, Y. (2013). Estudio del desperdicio del mucilago de cacao en el cantón Naranjal (provincia del Guayas). *Revista ECA Sinergia*, 4(4), 53-54.

Delgado-Gutiérrez, N. (2018). Plan de manejo integral de residuos derivados de la extracción de la pulpa de cacao en la hacienda Bellavista, Luz de América,

provincia de Azuay-Ecuador. Universidad de Cuenca, Ecuador.

FAO. (1987). Codex Alimentarius. Codex stan 162-1987 norma del codex para el vinagre. Disponible en: http://www.alimentosargentinos.gob.ar/contenido/marco/Codex_Alimentarius/normativa/codex/stan/162-1987.PDF

Ferreira, M., Schwab, M., Davies, C., Gerard, L., & Hours, R. (2012). Influencia del caudal de aire, temperatura y velocidad de agitación en el proceso discontinuo de acetificación para la obtención de vinagre de naranja (*Citrus sinensis* var. W. Navel). *Scientia Agropecuaria*, 3(1), 61-65.

INEN. (2003). NTE INEN 2296. Vinagre. Requisitos. Quito-Ecuador: Norma Técnica Ecuatoriana.

Llaguno, C., & Polo, C. (1991). El vinagre de vino. Consejo Superior de Investigaciones Científicas. Madrid, España.

Muñoz, E. (1997). Evolución de las relaciones entre biotecnología, industria y sociedad: el Caso español. Madrid: Centro de Estudios para el Fomento de la Investigación-CEFI Fundación.

Ortiz-Valbuena, K. & Álvarez-León, R. (2015). Efecto del vertimiento de subproductos del beneficio de cacao (*Theobroma cacao* L.) sobre algunas propiedades químicas y biológicas en los

- suelos de una finca cacaotera, municipio de Yaguara (Huila, Colombia). *Bol. Cient. Mus. Hist. Nat. U. de Caldas*, 19(1), 65-84.
- Romo, S. (2011). Obtención de vinagre a partir de la biofermentación de residuos de banano y otras frutas para su industrialización. Universidad de las Américas. Facultad de Ingeniería y Ciencias Agropecuarias. Ingeniería Agroindustrial y de Alimentos, Quito, Ecuador.
- Sarabia, C. & Rodríguez, R. (2012). Efecto del método de fermentación acética en las características físico-químicas y sensoriales en vinagre de naranja agria (*Citrus x aurantium*) y piña (*Ananas comosus*). Zamorano, Honduras: Zamorano, Departamento de agroindustria alimentaria.
- Téllez, J. & Cote, M. (2006). Alcohol Etilico: Un tóxico de alto riesgo para la salud humana socialmente aceptado. Facultad de Medicina: Universidad Nacional de Colombia., pp. 33-34.
- Yoneda, N., Kusano, S., Yasui, M., Pujado, P., & Wilcher, S. (2001). Recent advances in processes and catalysts for the production of acetic acid. *Applied Catalysis A: General*, 221(1-2); 253-265., doi: 10.1016/S0926-860X(01)00800-6