

UNEMI

UNIVERSIDAD ESTATAL DE MILAGRO

REPÚBLICA DEL ECUADOR

UNIVERSIDAD ESTATAL DE MILAGRO

VICERRECTORADO DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

INFORME DE INVESTIGACIÓN PREVIO A
LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO DE:

MAGÍSTER EN BIOTECNOLOGÍA

TEMA:

COMPARACION DE EFICACIA DE *Saccharomyces Cerevisiae*
FERMIVIN® 7013 Y *Saccharomyces Cerevisiae* COMERCIAL
"INSTAFERM®" EN LA OBTENCIÓN DE ETANOL A PARTIR DE
LA FERMENTACIÓN ALCOHÓLICA DEL MUCÍLAGO DE
CACAO

Autor:

TANIA ANNABEL LUNA CALDERÓN
VERENISE YAQUELINE COBOS TORRES

Director

Mgs. BARZALLO GRANIZO DIEGO GEOVANNY PhD.

Milagro, 2024

Derechos de autor

**Sr. Dr.
Fabricio Guevara Viejo**
Rector de la Universidad Estatal de Milagro
Presente.

Yo, **TANIA ANNABEL LUNA CALDERON, VERENISE YAQUELINE COBOS TORRES**, en calidad de autor y titular de los derechos morales y patrimoniales de este informe de investigación, mediante el presente documento, libre y voluntariamente cedo los derechos de Autor de este proyecto de desarrollo, que fue realizada como requisito previo para la obtención de mi Grado, de Magister en Biotecnología, como aporte a la Línea de Investigación **AMBIENTE: MANEJO DE ORGANISMOS GENETICAMENTE MODIFICADOS** de conformidad con el Art. 114 del Código Orgánico de la Economía Social de los Conocimientos, Creatividad e Innovación, concedo a favor de la Universidad Estatal de Milagro una licencia gratuita, intransferible y no exclusiva para el uso no comercial de la obra, con fines estrictamente académicos. Conservo a mi favor todos los derechos de autor sobre la obra, establecidos en la normativa citada.

Así mismo, autorizo a la Universidad Estatal de Milagro para que realice la digitalización y publicación de este Informe de Investigación en el repositorio virtual, de conformidad a lo dispuesto en el Art. 144 de la Ley Orgánica de Educación Superior.

El autor declara que la obra objeto de la presente autorización es original en su forma de expresión y no infringe el derecho de autor de terceros, asumiendo la responsabilidad por cualquier reclamación que pudiera presentarse por esta causa y liberando a la Universidad de toda responsabilidad.

Milagro, 18 febrero 2024



Firmado electrónicamente por:
**TANIA ANNABEL LUNA
CALDERON**

TANIA ANNABEL LUNA CALDERON

0706717428



Firmado electrónicamente por:
**VERENISE YAQUELINE
COBOS TORRES**

VERENISE YAQUELINE COBOS TORRES

0705049930

Aprobación del director del Trabajo de Titulación

Yo, **BARZALLO GRANIZO DIEGO GEOVANNY** en mi calidad de director del trabajo de titulación, elaborado por **TANIA ANNABEL LUNA CALDERON, VERENISE YAQUELINE COBOS TORRES**, cuyo tema es **COMPARACION DE EFICACIA DE *Saccharomyces Cerevisiae* FERMIVIN® 7013 Y *Saccharomyces Cerevisiae* COMERCIAL “INSTAFERM®” EN LA OBTENCIÓN DE ETANOL A PARTIR DE LA FERMENTACIÓN ALCOHÓLICA DEL MUCÍLAGO DE CACAO**, que aporta a la Línea de Investigación **AMBIENTE: MANEJO DE ORGANISMOS GENETICAMENTE MODIFICADOS**, previo a la obtención del Grado Magister en biotecnología, Trabajo de titulación que consiste en una propuesta innovadora que contiene, como mínimo, una investigación exploratoria y diagnóstica, base conceptual, conclusiones y fuentes de consulta, considero que el mismo reúne los requisitos y méritos necesarios para ser sometido a la evaluación por parte del tribunal calificador que se designe, por lo que lo **APRUEBO**, a fin de que el trabajo sea habilitado para continuar con el proceso de titulación de la alternativa de Informe de Investigación de la Universidad Estatal de Milagro.

Milagro, 18 febrero 2024



Firmado electrónicamente por:
**DIEGO GEOVANNY
BARZALLO GRANIZO**

BARZALLO GRANIZO DIEGO GEOVANNY

0603923095

VICERRECTORADO DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO
DIRECCIÓN DE POSGRADO
CERTIFICACIÓN DE LA DEFENSA

El TRIBUNAL CALIFICADOR previo a la obtención del título de **MAGÍSTER EN BIOTECNOLOGÍA**, presentado por **ING. LUNA CALDERÓN TANIA ANNABEL**, otorga al presente proyecto de investigación denominado "COMPARACION DE EFICACIA DE SACCHAROMYCES CEREVISIAE FERMIVIN® 7013 Y SACCHAROMYCES CEREVISIAE COMERCIAL "INSTAFERM®" EN LA OBTENCIÓN DE ETANOL A PARTIR DE LA FERMENTACIÓN ALCOHÓLICA DEL MUCÍLAGO DE CACAO", las siguientes calificaciones:

TRABAJO ESCRITO	60.00
SUSTENTACIÓN	34.83
PROMEDIO	94.83
EQUIVALENTE	Muy Bueno



Firmado electrónicamente por:
JUAN DIEGO VALENZUELA COBOS

Ph.D. VALENZUELA COBOS JUAN DIEGO
PRESIDENTE/A DEL TRIBUNAL



Firmado electrónicamente por:
LUIS EDUARDO CAGUA MONTANO

Mgs CAGUA MONTAÑO LUIS EDUARDO
VOCAL



Firmado electrónicamente por:
KAREN ALEXANDRA RODAS PAZMIÑO

Mgs RODAS PAZMIÑO KAREN ALEXANDRA
SECRETARIO/A DEL TRIBUNAL

VICERRECTORADO DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO
DIRECCIÓN DE POSGRADO
CERTIFICACIÓN DE LA DEFENSA

El TRIBUNAL CALIFICADOR previo a la obtención del título de **MAGÍSTER EN BIOTECNOLOGÍA**, presentado por **BQF. COBOS TORRES VERENISE YAQUELINE**, otorga al presente proyecto de investigación denominado "COMPARACION DE EFICACIA DE SACCHAROMYCES CEREVISIAE FERMIVIN® 7013 Y SACCHAROMYCES CEREVISIAE COMERCIAL "INSTAFERM®" EN LA OBTENCIÓN DE ETANOL A PARTIR DE LA FERMENTACIÓN ALCOHÓLICA DEL MUCÍLAGO DE CACAO", las siguientes calificaciones:

TRABAJO ESCRITO	60.00
SUSTENTACIÓN	36.50
PROMEDIO	96.50
EQUIVALENTE	Excelente



Firmado electrónicamente por:
JUAN DIEGO VALENZUELA COBOS

Ph.D. VALENZUELA COBOS JUAN DIEGO
PRESIDENTE/A DEL TRIBUNAL



Firmado electrónicamente por:
LUIS EDUARDO CAGUA MONTANO

Mgs CAGUA MONTAÑO LUIS EDUARDO
VOCAL



Firmado electrónicamente por:
KAREN ALEXANDRA RODAS PAZMINO

Mgs RODAS PAZMIÑO KAREN ALEXANDRA
SECRETARIO/A DEL TRIBUNAL

DEDICATORIA

Con todo amor dedicamos este trabajo de titulación a la motivación más grande que Dios y la vida pudo concedernos, a nuestros hermosos hijos, por ser la más grande fuente de inspiración, por impulsarnos a cumplir todos nuestros sueños y anhelos con el único objetivo de ver en sus rostros grandes sonrisas y poder brindarles la seguridad de un futuro próspero.

A nuestros padres, que con su ejemplo, apoyo incondicional y amor infinito nos han forjado y guiado siempre, quienes nos han inculcado que con esfuerzo y dedicación se puede lograr todo en la vida,

Tania Annabel Luna Calderón.

Verenise Yaqueline Cobos Torres

AGRADECIMIENTOS

Nuestro agradecimiento a Dios en primera instancia por todas las bendiciones derramadas, por la fuerza y constancia para que nuestros objetivos, anhelos sean alcanzados a lo largo de estos años y por esta nueva oportunidad de crecimiento profesional.

En segunda instancia a nuestra familia por ser los pilares fundamentales en nuestras vidas.

A nuestro tutor por todo su compromiso, esfuerzo y conocimientos impartidos en todo este tiempo para culminar este trabajo de titulación.

Tania Annabel Luna Calderón.

Verenise Yaqueline Cobos Torres

RESUMEN

La presente investigación tiene como objetivo obtener etanol a partir de la fermentación alcohólica del mucilago de cacao (*Theobroma cacao*), ya que este sustrato por desconocimiento de los productores cacaoteros de la provincia de El Oro es considerado como un desperdicio que se busca aprovechar y obtener así un producto de mayor valor agregado. En la caracterización del mucilago se determinó diferentes parámetros físico-químicos que incluye: composición química, pH mediante potenciometría, acidez total por volumetría, sólidos totales y cenizas.

En este contexto, la obtención del mucilago se realizó bajo condiciones asépticas, recolectando mazorcas sanas. Una vez abiertas los granos frescos de cacao fueron colocados en mayas, donde por presión manual se extrajo el líquido. Posteriormente, se realizó la filtración y esterilización del mucilago en una autoclave a 120°C por 15 minutos. La fermentación se lo realizó colocando el mucilago esterilizado en envases de vidrio ámbar herméticamente cerrado con un corcho natural, posteriormente se colocó el inóculo las levaduras *Saccharomyces cerevisiae* comercial y *Saccharomyces cerevisiae modificada*. El proceso de fermentación fue controlado durante 5 días a diferentes temperaturas: 15, 25 y 30°C utilizando una estufa. Cada 12 horas se realizó la medición de pH, °Brix y contenido de etanol mediante reflectometría. Para la producción de etanol se elaboró nueve tratamientos, realizando una comparación entre ambos tipos de levaduras, los cuales durante el proceso de fermentación alcanzaron los siguientes resultados: T1: 56,10 g/L, T2: 71,91 g/L, T3: 66,30 g/L, T4: 56,10 g/L, T5: 56,10 g/L, T6: 39,53 g/L, T7: 45,90 g/L, T8: 46,41 g/L y T9: 45,90 g/L de concentración de etanol.

En conclusión el mucilago de cacao de la variedad Fino de Aroma (Arriba) representa un sustrato idóneo para la producción de etanol, además se estableció que el T2 es el de mayor eficacia ya que consumió casi en su totalidad los azúcares del mucilago de cacao, es decir obtuvo mayor cantidad de etanol y en menor tiempo, asumiendo que la producción de etanol además de estar vinculada con los requerimientos nutricionales (mayormente nitrógeno) de la levadura *Saccharomyces Cerevisiae comercial* "Instaferm®" tiene relación con la temperatura en la que se somete dicho proceso, siendo los 25°C la temperatura óptima de ésta fermentación alcohólica.

Palabras Claves: Etanol, fermentación, *Saccharomyces cerevisiae*, *Theobroma cacao*, Mucilago de cacao.

ABSTRACT

The objective of this research is to obtain ethanol from the alcoholic fermentation of cocoa mucilage (*Theobroma cacao*), since this substrate, due to lack of knowledge of cocoa producers in the province of El Oro, is considered a waste that they seek to take advantage of and obtain. thus a product with greater added value. In the characterization of the mucilage, different physical-chemical parameters were determined, including: chemical composition, pH by potentiometry, total acidity by volumetrics, total solids and ashes.

In this context, the mucilage was obtained under aseptic conditions, collecting healthy ears. Once opened, the fresh cocoa beans were placed in containers, where the liquid was extracted by manual pressure. Subsequently, the mucilage was filtered and sterilized in an autoclave at 120°C for 15 minutes. Fermentation was carried out by placing the sterilized mucilage in amber glass containers hermetically closed with a natural cork, then the inoculum was placed with the commercial *Saccharomyces cerevisiae* and modified *Saccharomyces cerevisiae* yeasts. The fermentation process was controlled for 5 days at different temperatures: 15, 25 and 30°C using an oven. Every 12 hours, pH, °Brix and ethanol content were measured by reflectometry. For the production of ethanol, nine treatments were prepared, making a comparison between both types of yeast, which during the fermentation process achieved the following results: T1: 56.10 g/L, T2: 71.91 g/L, T3 : 66.30 g/L, T4: 56.10 g/L, T5: 56.10 g/L, T6: 39.53 g/L, T7: 45.90 g/L, T8: 46.41 g /L and T9: 45.90 g/L ethanol concentration.

In conclusion, the cocoa mucilage of the Fino de Aroma variety (Above) represents an ideal substrate for the production of ethanol. It was also established that T2 is the most effective since it consumed almost all of the sugars from the cocoa mucilage. That is to say, it obtained a greater amount of ethanol and in less time, assuming that the production of ethanol, in addition to being linked to the nutritional requirements (mostly nitrogen) of the commercial *Saccharomyces Cerevisiae* yeast "Instaferm®", is related to the temperature to which it is subjected. said process, with 25°C being the optimal temperature for this alcoholic fermentation.

Keywords: Ethanol, fermentation, *Saccharomyces cerevisiae*, *Theobroma cacao*, Cocoa mucilage

LISTA DE FIGURAS

Imagen 1 .Raíz de cacao	25
Imagen 2. Tallo y Ramas de Cacao	25
Imagen 3. Hojas de Cacao	26
Imagen 4. <i>Flor de Cacao</i>	27
Imagen 5. Fruto de Cacao.....	27
Imagen 6. Semilla de Cacao	28
Imagen 7. Cacao Nacional	29
Imagen 8. Cacao CCN-51	30
Imagen 9. Mucilago de Cacao.....	32
Imagen 10. <i>Saccharomyces cerevisiae</i> al microscopio	37
Imagen 11. Presentación comercial de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> Fermivin® 7013	38
Imagen 12.Comparación de Fermivin® 7013 en relación de azúcares – grado alcohólico.....	39
Imagen 13. Propiedades Enológicas de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> Fermivin® 7013	39
Imagen 14. Modelo de Bioreactor	41
Imagen 15. Proceso de extracción de Mucilago de Cacao	47
Imagen 16. Proceso de fermentación del Mucilago de Cacao.....	51
Imagen 17. Diseño de Fermentador	52

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Variables Dependientes e Independientes.....	20
Tabla 2. Azúcares del mucilago de cacao	32
Tabla 3. Composición química del mucilago de cacao.....	33
Tabla 4. Características del metabolismo de FERMIVIN® 7013.....	40
Tabla 5. Producción de bioetanol a partir de diferentes materias primas.....	42
Tabla 6. Diseño del experimento.....	45
Tabla 7. Métodos de análisis de laboratorio	48
Tabla 8. Análisis Físico-Químico y Composición Química del Mucilago de Cacao Variedad Nacional	53
Tabla 9. Composición Elemental del Mucilago de Cacao Variedad Nacional	54

LISTA DE ANEXOS

Anexo 1. Esterilización del Mucilago de Cacao.....	67
Anexo 2. Preparación de Fermentador.....	67
Anexo 4. <i>Saccharomyces cerevisiae</i> Comercial marca Instaferm®.....	67
Anexo 3. <i>Saccharomyces cerevisiae</i> Fermivin® 7013.....	67
Anexo 5. Pesaje de Levaduras	68
Anexo 6. Equipo de Refrigeración para fermentación A 15°C.....	68
Anexo 7. Rotulación de Muestras	68
Anexo 8. Estufa para fermentación a 30°C.....	69
Anexo 10. Medición de °Brix	69
Anexo 9. Extracción de Muestra	69
Anexo 11. Medición de pH.....	70
Anexo 12. Cromatógrafo de gases modelo Agilent 7820A	70

LISTA DE GRAFICAS

Gráfico 1. Grupos Funcionales del Mucilago de Cacao Variedad Nacional	55
Gráfico 2. Comparación de los azúcares fermentables y etanol durante la fermentación a temperatura de 15 °C	56
Gráfico 3. Comparación del pH durante la fermentación a temperatura de 15°C. 57	
Gráfico 4. Comparación de los azúcares fermentables y etanol durante la fermentación a temperatura de 25 °C	57
Gráfico 5. Comparación del pH durante la fermentación a temperatura de 25°C. 59	
Gráfico 6. Comparación de los azúcares fermentables y etanol durante la fermentación a temperatura de 30 °C	60
Gráfico 7. Comparación del pH durante la fermentación a temperatura de 30°C . 60	
Gráfico 8. Comparación de tratamientos en la Producción de Etanol durante la fermentación.....	61

ÍNDICE / SUMARIO

Aprobación del director del Trabajo de Titulación	3
Aprobación del tribunal calificador	4
DEDICATORIA	5
AGRADECIMIENTOS	6
RESUMEN	7
ABSTRACT	8
LISTA DE FIGURAS	9
LISTA DE TABLAS	10
LISTA DE ANEXOS	10
LISTA DE GRAFICAS	11
INTRODUCCIÓN	15
CAPÍTULO I: EL PROBLEMA DE LA INVESTIGACIÓN	17
1.1 Planteamiento del problema	17
1.2 Delimitación del problema	18
1.3 Formulación del problema	18
1.4 Preguntas de investigación	18
1.5 Determinación del tema	18
1.6 Objetivo general	19
1.7 Objetivos específicos	19
1.8 Hipótesis	19
1.8.1 Hipotesis Nula	19
1.8.2 Hipótesis Alternativa	19
1.9 Declaración de las variables (operacionalización)	20
1.10 Justificación	20
1.11 Alcance y limitaciones	21

CAPÍTULO II: Marco teórico referencial	22
2.1 Antecedentes	22
2.2 Contenido Teórico	23
2.2.1 Origen del cacao.....	23
2.2.3 Tipos de cacao que cultiva Ecuador	28
2.2.4 Aplicaciones del cacao	30
2.2.5 Mucílago o pulpa de cacao	31
2.2.6 Composición del mucílago del cacao.....	32
2.2.7 Microbiología del cacao	33
2.2.8 Fermentación del mucílago de cacao	35
2.2.9 Las Levaduras.....	35
2.2.10 Uso de levaduras en la fermentación	36
2.2.11 Propiedades de la levadura de cerveza	36
2.2.12 <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	37
2.2.13 Levaduras <i>Saccharomyces cerevisiae</i> Fermivin®.....	38
2.2.14 La fermentación alcohólica	40
2.2.15 Biorreactor	41
2.2.16 Bioetanol.....	42
2.2.17 El Bioetanol en la actualidad.....	43

CAPÍTULO III: DISEÑO METODOLÓGICO	45
3.1 Tipo y diseño de investigación	45
3.2 La población y la muestra.....	45
3.2.1 Características de la población	45
3.2.2 Delimitación de la población	46
3.2.3 Tipo de muestra	46
3.2.4 Tamaño de la muestra	46
3.3 Los métodos y las técnicas.....	46
3.3.1 Obtención del mucílago de cacao.....	46
3.3.2 Caracterización del mucilago de cacao	47
3.3.3 Proceso de Fermentación.....	50
3.3.4 Determinación de la Concentración de Etanol	52
CAPÍTULO IV: ANÁLISIS E INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS	53
4.1 Análisis de los resultados	53
Caracterización Del Mucilago De Cacao Variedad Fino de Aroma (Arriba)	53
Proceso de Fermentación	55
CAPÍTULO V: CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	63
5.1 CONCLUSIONES	63
5.2 RECOMENDACIONES.....	63
BIBLIOGRAFÍA	64
ANEXOS	67

INTRODUCCIÓN

El Banco Central del Ecuador (2015), indicó que Ecuador ha tenido grandes picos de formidables procesos económicos. Entre los años 1880 y 1890 nuestro país se convirtió en el exportador más fuerte de cacao en el mundo. Los sitios ubicados en las zonas costeras del Ecuador eran el núcleo del comercio de la nación, las ganancias en circulación producto de buen tiempo para el cacao, dieron lugar al nacimiento de los primeros bancos, permitiendo la comercialización de diversos productos ecuatorianos en mercados internacionales.(Alcívar, Quezada, Barrezueta, Garzón, & Carvajal, 2019)

El cultivo cacao es uno de las actividades de la agricultura que al igual que la ganadería o pesca, contribuye al impulso económico de nuestro país Ecuador, ya que este se exporta cubriendo en los mejores momentos el 60% de requerimiento internacional, según la Organización Internacional del Cacao y a la vez sirve como materia prima de variedad de productos que se elaboran en Ecuador. Nuestra ubicación geográfica es la principal razón por la que el cacao fino se da tan bien en Sur América y por ende en Ecuador, pero del cacao podemos aprovechar también el mucilago que es considerado como un desperdicio.

El mucilago es una sustancia untuosa, por lo general translúcido que proviene de la fruta de la planta de cacao. Es un producto vegetal, de alto peso molecular, mayor a 200.000g/mol cuya estructura completa ha sido difícil hasta el presente tiempo de conocer totalmente, está compuesto de polisacáridos con la misma cantidad de azúcares que las pectinas y gomas. (Álava, 2020)

La importancia de este estudio no solo es porque el mucilago de cacao es un componente muy importante de la planta de cacao, sino que hasta la actualidad no ha sido aprovechado como se esperaría, ya que al desperdiciar este subproducto natural no solo conlleva un impacto ambiental sino pérdidas económicas que impiden el progreso de los agricultores dedicados al negocio del cacao (Moreira, 2019).

Si el del mucilago tuviera un adecuado aprovechamiento, este sería el origen de una activación económica de las regiones, generando un valor agregado a este subproducto, sin embargo, hace falta incentivar y promover la importancia de la utilización del mucilago de cacao, de las condiciones y recursos para su procesamiento (Moreira, 2019).

Dentro de la fruta del cacao se encuentran las semillas de las cuales se extrae el mucilago de cacao, el mismo que en su composición tiene más del 50% de agua y 0.7% de glucosa y fructosa, ácidos cítricos. En nuestro país, no hay procesos industriales que permitan aprovechar las bondades del mucilago de cacao, razón por la que conocer sus propiedades fisicoquímicas ha sido muy importante tal como se hizo en el trabajo de investigación de (Álava, 2020), donde brindan importantes detalles de la composición del mucilago de cacao y en base a sus componentes tomar medidas adecuadas para el correcto tratamiento.

Uno de los beneficios del aprovechamiento del mucilago de cacao es la obtención de etanol por medio del proceso de fermentación de levaduras, siendo el uso de levaduras una actividad muy importante y común en la industria de los alimentos. En el grupo de las levaduras tenemos una pionera que es la levadura *Saccharomyces cerevisiae*, este microorganismo industrial es el más utilizado, gracias a esta levadura tenemos producción de bebidas alcohólicas de diferentes tipos, sino también de la producción a gran escala de bioetanol producidos anualmente para beneficio del hombre.(Walker & Walker, 2018)

Por lo que el presente trabajo de investigación tiene como finalidad dar un valor agregado al mucilago de cacao, obteniendo etanol mediante la fermentación de los azúcares presentes en el mismo utilizando levaduras: *Saccharomyces cerevisiae*, una será levadura comercial y la otra modificada genéticamente y así conocer la eficacia de la producción de etanol entre ambos tipos de levaduras para la fermentación de azúcares.

Además de crear otras fuentes de ingresos económicos para los agricultores, de esta forma contribuir a mejorar sus posibilidades económicas, así como su calidad de vida, de la misma manera tener un impacto positivo en el medio ambiente, pues al disminuir el desperdicio de mucilago se está evitando la contaminación del suelo y menor propagación de microorganismos patógenos para las plantas.

CAPÍTULO I: EL PROBLEMA DE LA INVESTIGACIÓN

1.1 Planteamiento del problema

Históricamente el cacao representa un motor importante del desarrollo económico, permitiendo así poder dar fuentes de trabajo además del aporte económico que permite el aumento de la circulación monetaria, lo que representa una gran oportunidad desde el punto de vista social, cultural y económico.

El Ecuador es uno de los mayores productores a nivel mundial de cacao, en el 2004 se sembraron 3362.132 has, divididas en 50.000 sitios de producción. En el 2013 según las cifras a la Asociación Nacional de Exportadores e Industriales de Cacao del Ecuador (ANECACAO), el país exportó aproximadamente 13.012,64.T.M granos de cacao. (Arteaga Yadira Estrella, 2013).

La provincia de el Oro es reconocida a nivel mundial por su alta productividad de cacao, siendo además un exportador de materia prima de calidad, sin embargo, el líquido exudado (mucilago) provenientes de los granos, el cual es extraído durante el proceso de recolección, cura, fermentación y secado de los granos, es desaprovechado por desconocimiento o falta de recursos de los productores cacaoteros. Según la investigación realizada por (Arteaga Yadira Estrella, 2013) el desperdicio de este líquido exudado se da por factores: 72% por desconocimiento, 22% por desinterés, y el 6% por falta de recursos para innovación y desarrollo.

Por ende, desechar el mucilago de cacao, afecta a diferentes puntos de vista, en desaprovechamiento económico, pues al no dar un tratamiento adecuado a los mucilagos de cacao este recurso es desperdiciado, así también el impacto ambiental que experimenta el suelo al desechar constantemente y en grandes cantidades el mucilago, promoviendo la proliferación de microorganismos, parásitos, insectos y hongos que pueden afectar el desarrollo de los demás cultivos.

1.2 Delimitación del problema

Este trabajo de investigación referente al aprovechamiento del mucilago de cacao tiene como fin dar un valor agregado a este habitual desperdicio, para la obtención de bioetanol mediante la fermentación de los azúcares presentes en el mucilago, utilizando levaduras como: *Saccharomyces cerevisiae* liofilizada comercial y *Saccharomyces cerevisiae* modificada genéticamente, de esta manera se evaluará la eficiencia durante la producción de etanol.

Así también este trabajo contribuirá a generar otras fuentes de ingresos económicos para los agricultores que se dedican al procesamiento de cacao, mejorado su economía y calidad de vida. Otro aporte de este trabajo será disminuir el desperdicio del mucilago y el derrame indiscriminado de dicho líquido exudado en el suelo, lo cual genera daño al medio ambiente, pues facilita la propagación de microorganismos patógenos, insectos y parásitos, causando además riesgo de enfermedades a los demás cultivos a su alrededor.

1.3 Formulación del problema

¿Es posible obtener etanol a partir del mucilago de cacao mediante fermentación alcohólica?

1.4 Preguntas de investigación

- ¿Cuál sería la metodología más amigable con el medio ambiente para la obtención de la mayor cantidad de bioetanol?
- ¿Cuál sería el análisis o técnica de caracterización sería la más importante realizar para la obtención de etanol?
- ¿La levadura *Saccharomyces cerevisiae* modificada genéticamente será más eficiente en la producción de etanol?

1.5 Determinación del tema

Producción de etanol a partir del mucílago de cacao (*Theobroma Cacao*) mediante fermentación alcohólica.

1.6 Objetivo general

Obtener y evaluar la cantidad de etanol a partir de la fermentación alcohólica de los azúcares presentes en el mucilago de cacao, utilizando la levadura *Saccharomyces cerevisiae* comercial y *Saccharomyces cerevisiae* genéticamente modificada.

1.7 Objetivos específicos

- Caracterizar mediante análisis físico químicas el mucilago de cacao.
- Producir etanol a partir de la fermentación alcohólica de los azúcares existentes en el mucilago.
- Identificar la producción de etanol presente en la muestra con mucilago de cacao aplicando Refractometría.
- Establecer la eficiencia en la producción de etanol con relación al tiempo y concentración de etanol entre la levadura *Saccharomyces cerevisiae* comercial y *Saccharomyces cerevisiae* genéticamente modificada.

1.8 Hipótesis

1.8.1 Hipótesis Nula

No se puede obtener etanol a partir del mucilago de cacao aplicando el método de fermentación alcohólica.

1.8.2 Hipótesis Alternativa

Se puede obtener etanol a partir del mucilago de cacao aplicando el método de fermentación alcohólica.

1.9 Declaración de las variables (operacionalización)

Tabla 1. Variables Dependientes e Independientes.

Variables Dependientes	<ul style="list-style-type: none">• Concentración de Etanol• °Brix y pH presente en Mucilago de Cacao
Variables Independientes	<ul style="list-style-type: none">• Temperaturas de Fermentación• Tipo de Levadura• Cinética de reacción de fermentación

Fuente: (Luna&Cobos,2024)

1.10 Justificación

En este trabajo se desea obtener los máximos beneficios del líquido obtenido de las semillas de cacao y que es considerado erróneamente como desperdicio durante las diferentes etapas de tratamiento de los granos de cacao, para así ayudar a evitar el grado de contaminación producto de este desecho no aprovechado en nuestra provincia de El Oro.

De la misma manera, el efecto de aprovechar el mucilago de cacao es muy positivo, puesto que también se contribuye a reducir los efectos de contaminación producidos por la descomposición del mucilago por la falta de conocimiento de un aprovechamiento responsable de buenas prácticas agrarias. La meta principal de esta investigación es obtener etanol a partir de la fermentación de los azúcares presentes en el mucilago de cacao, a través de este estudio se pueda lograr en un futuro mejorar procedimientos, otras técnicas que permitan métodos más efectivos y con impactos positivos en aspectos importantes del ambiente y productividad.

Un aporte también muy importante del presente trabajo sería dentro de la economía circular que es un concepto que toma una gran importancia en la actualidad, más el apoyo de las tecnologías, biotecnologías, que permite poder realizarlo, pues la economía circular es un formato de producción y consumo donde la meta es reutilizar, reponer, renovar y reciclar materiales y productos que ya existen y que se pueda añadir un valor las veces que pueda hacerse, así el ciclo de vida de los productos se hace más largo. (Avecillas, 2023)

Este bioetanol que se obtendrá del aprovechamiento del mucílago de cacao puede ser introducido en muchas industrias que usan el etanol como materia prima, ya sea para medicamentos, alimentos, productos naturales, productos higiénicos, cosméticos y demás

1.11 Alcance y limitaciones

El alcance de este trabajo de investigación de obtener etanol a partir de la fermentación de los azúcares presentes en el mucílago de cacao con la intervención de la levadura *Saccharomyces cerevisiae*, a partir de una levadura comercial y otra modificada genéticamente, para conocer con qué tipo de levadura hay más producción de etanol. El etanol obtenido se cuantificará mediante consumo de azúcares fermentables (°Brix) x y posterior cálculo a concentración de etanol y así establecer con qué tipo de levadura se dio una mayor producción de etanol.

Este producto obtenido tiene como objetivo promover una economía circular al dar un valor agregado a un desecho como lo es el mucílago de cacao, igualmente se contribuirá a minimizar el impacto ambiental, ya que ese residuo no será vertido en el suelo sino aprovechado para crear otros productos, además de que no servirá como nutriente para el crecimiento de hongos patógenos para las plantas. Por otro lado, se logrará un incremento de la economía de los agricultores que trabajan el cacao, ya que el bioetanol puede ser comercializado como materia prima en diferentes mercados y para diferentes usos industriales.

Las limitaciones dentro del presente estudio es que no contamos con los equipos necesarios para poder realizar la cantidad de pruebas que consideramos necesarias para poder caracterizar de manera completa al mucílago de cacao, por lo que las pruebas que no se realizan en este trabajo se podrán realizar en futuras investigaciones. Adicionalmente el presente trabajo está solo enfocado en el desperdicio como es el mucílago de cacao, sin embargo, el cacao posee otros productos que pueden ser aprovechados dentro de la economía circular como es la cáscara del fruto, la cascarilla, ramas, hojas, y tronco, por lo que en futuras investigaciones sería ideal plantear diferentes soluciones para aprovechar estos desperdicios de la planta de cacao.

CAPÍTULO II: Marco teórico referencial

2.1 Antecedentes

En el año 2023 se realizó un estudio que se basó en la utilización del mucílago de cacao para aprovechar sus beneficios y obtener una bebida alcohólica aplicando dos diferentes tipos de levaduras, además de su relación con factores determinados como fueron los grados Brix, el pH, el grado alcohólico en muestras de mucilago de cacao de dos lugares ubicados en la provincia de Guayas. Para este trabajo se caracterizó el mucílago del cacao variedad CCN51 y el mucílago nacional mediante pruebas fisicoquímicas como acidez titulable, contenido de azúcares, pH, grados Brix.

Así también se realizó pruebas fisicoquímicas para analizar la calidad en relación de grados alcohólicos, pH, grados Brix del mosto obtenido durante el proceso de fermentación. Además, se realizaron pruebas de aceptación sensorial con participantes para evaluar su aceptación en cuanto al aroma. Este estudio permitió establecer que el mucílago de cacao CCN51 tuvo mayor porcentaje glúcido en comparación al cacao nacional y por ende más altos grados Brix.(Avecillas, 2023)

En la investigación del 2020, donde se caracterizó el mucílago de cacao de *Theobroma cacao* con interés la composición de azúcares, donde se resalta el potencial que tiene el mucilago de cacao, sin embargo, el poco conocimiento sobre los usos y beneficios del mucílago de cacao, donde se hizo una comparación de la concentración de azucares en dos tipos de cacao el Nacional y CCN-51. Para esta investigación se tomaron muestras de la provincia de Manabí, en la parroquia Calceta, donde se identificó azucares como glucosa, sacarosa y fructosa, mediante cromatografía de gases con espectrometría de masas. Los resultados obtenidos reportan que la variedad nacional contenía 1.83 % de azúcar fructosa y 2.1 % de glucosa que la variedad CCN-51, en este estudio también indican la contaminación que genera el mal manejo del mucílago de cacao, ya que su composición rica en azucares lo hace más propenso a fermentarse de manera rápida.(Álava, 2020)

En la investigación del 2019, se evaluó el comportamiento de las levaduras en relación a dos variedades de mucílago de cacao Nacional y CCN -51 del tipo

Theobroma cacao para aplicarlo en procesos de fermentación, donde se realizó el aislamiento de las levaduras naturales presentes en el mucílago de cacao para la fermentación fuese más natural, es decir no utilizar levaduras comerciales para acelerar la fermentación sino obtener las propias levaduras presentes en el exudado, esto se realizó en la provincia de los Ríos, cantón Quevedo.

Los medios de cultivo que se utilizaron para el aislamiento microbiológico fueron con medios de cultivo líquidos: Extracto de malta, PD, Sabouraud, donde se obtuvo un aislamiento más exitoso con el tipo de cacao Nacional, sin embargo, en cuanto a la reproducción de las levaduras se obtuvo mejor resultado con el T.2 - PD + CCN-51. Posteriormente la levadura aislada se sometió a varias observaciones de morfología y se determinó que la levadura existente era *Saccharomyces cerevisiae*, además se establecieron pruebas que permitieron establecer similitudes entre las levaduras aisladas y las levaduras comerciales.(Guerra, 2019a)

En otro trabajo reportado en literatura se ha dado importancia a la obtención de mucílago de cacao, para posteriormente procesarlo y aplicarlo dentro del campo agrícola, aquí se rescata que con el mucílago de cacao se puede realizar muchos subproductos así disminuir el impacto en el medio ambiente y a la vez obtener un beneficio económico. Se planteó investigar la aplicación del mucílago de cacao en el campo agrícola, para esto se investigó sobre las mejores técnicas, haciendo uso de la información de protocolos actuales que han permitido lograr un producto que goza de estabilidad. En la primera parte del trabajo se aplicó como fertilizante con grandes beneficios por su abundante variedad bacteriana que son muy positivas y además aportan nutrientes que aportan gran beneficio de las plantas, hierro, cobre y zinc. En la segunda parte, se utilizó como un herbicida sin embargo su beneficio no ha sido muy preciso, finalmente en la tercera parte se usó como fungicida, pero aún no se concreta su eficacia pues se inició con esta parte del estudio en este año. (Castro, 2023).

2.2 Contenido Teórico

2.2.1 Origen del cacao

El cultivo de cacao está dividido a nivel de algunos países. La producción a nivel mundial está en los países que conforman América del Sur, El Caribe, África, Asia,

Oceanía, principalmente lugares con mucha humedad y climas tropicales. Su cultivo se originó en América, pero no es posible indicar con exactitud el lugar, sin embargo, hasta la actualidad es motivo de investigación donde fue el inicio de su cultivo. Otros trabajos de investigación señalan que el cultivo se originó en México y América Central, las culturas mexicanas conocían el valor del cacao desde aquel entonces, antes de que sea descubierto en América, tanto así que el cacao era considerado un árbol con divinidad, beber su jugo era señal de conocimiento, por todo eso Linneo le dio el nombre de *Theobroma*, que significa alimento de los dioses. Ya para la era de Cristóbal Colon, los mayas eran los pioneros del cultivo de cacao, habían trabajado tanto en estos cultivos, que conocían todo de ellos llegando a tener conocimiento de varias técnicas, de cómo hacer que las semillas duren más, elaborando bebidas, llegando el cacao a ser tan popular y parte de la dieta diaria de cualquier ciudadano de distinto estrato social. (Miguel Estrada, Romero, & Moreno, 2011)

En otros estudios realizados por señalan que el cacao tuvo origen en Suramérica especialmente en Colombia, Perú, Ecuador, Brasil donde se han observado diferentes variedades. El cacao criollo posiblemente tuvo origen desde Venezuela, Colombia, Ecuador y América Central y México. Mientras que el cacao de variedad forastero tendría inicio por la amazonia distribuyéndose hacia Brasil y Guyanas. Posteriormente se conoció una tercera variedad que es el cacao Trinitario, sin embargo, por las características del cacao ecuatoriano algunos investigadores consideran que esta sería una cuarta variedad por sus cualidades en cuanto a sus propiedades aromáticas y gustativas (Zambrano, 2015) .

2.2.2 Forma de planta de cacao.

La planta de cacao está conformada por varias partes, las cuales se detallan a continuación:

2.2.2.1 Raíz

La raíz primaria, crece hacia abajo y puede tener longitudes diferentes, la forma de esta raíz puede variar considerando las características del suelo, de esta raíz primaria se desprenden una red de ramificaciones más pequeñas o secundarias.

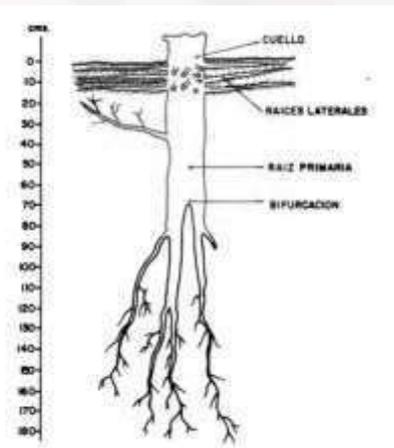


Imagen 1 .Raíz de cacao

Fuente:(Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura (IICA), 1982)

2.2.2.2 Tronco y Ramas

El tronco en sus primeras fases de crecimiento es vertical, que dura un tiempo entre 12 y 15 meses, estas tienen un vacío el mismo que es rico en mucilago. Posteriormente esta forma de crecer es interrumpida, luego se ve aparecer de 4 a 5 ramas pequeñas secundarias llamadas horquetas, estas horquetas tendrán un crecimiento horizontal, por debajo de la horqueta crecen normalmente brotes tres direcciones perpendiculares entre sí que se llaman chupones, estos chupones permitirán el crecimiento de nuevas horquetas y esto puede suceder de 3 a 4 veces seguidas en el tiempo (García, 2019).



Imagen 2. Tallo y Ramas de Cacao

Fuente:(Luna&Cobos,2024)

2.2.2.3 Hojas

Las hojas de las plantas de cacao son completas, con una medida aproximada de 15 a 50 cm de largo y de 5 a 20 cm de ancho, con los ápices muy largos o sin punta, son hojas iguales en los brotes con tres direcciones perpendiculares entre sí y desiguales en las ramas plagiotrópicas. La morfología del limbo puede variar, llegando a ser elíptica, ovada, con los peciolo que tienen dos tipos de engrosamiento, llamados pulvínulos, estos pulvínulos se encuentran muy cerca, los brotes que son jóvenes por lo general tienen un color antociánica, excepto los árboles mutados que suelen ser despigmentados (García, 2019).



Imagen 3. Hojas de Cacao

Fuente:(Luna&Cobos,2024)

2.2.2.4 Flor

Las flores del cacao tienen características hermafroditas, cuentan con 5 sépalos y 5 pétalos, 5 estambres, 5 estaminodios y 5 lóculos por ovario, están completas en todos sus verticilos de la flor y perfectas. Estas flores nacen en el tallo solas y a veces lo hacen en grupo, cuando lo hacen así se llaman cojines florales. Tienen un diámetro que varía entre 1 y 1.5 cm de largo, los sépalos son de prefloración valvar sin pigmentación o con pigmentación, los pétalos son de prefloración imbricada, donde tienen una base hueca seguido de un puente delgado y en un extremo superior grande con punta. Los 5 estaminodios no son fértiles y tienen como función actuar como órganos llamativos de insectos y a la vez cumplen la función de protección del gineceo. (Prado, 2019).



Imagen 4. Flor de Cacao

Fuente: (Dostert, Roque, Cano, La Torre, & Weigend, 2011)

2.2.2.5 Fruto

Los frutos del cacao tienen un tamaño que varía entre 10 y 42 cm, los mismos que pueden ser de forma esférica, elíptica, ovada, oblonga, abobada, en su superficie tienen aspecto rugoso y también pueden ser lisos, con un color rojizo o verdusco cuando están jóvenes, según el tipo de cacao. En el ápice tienen forma redondeado, atenuado, aguda, obtuso, dentado, de cascara gruesa por lo general, pero también puede ser delgada, con sus surcos profundos o superficiales. (García, 2019).



Imagen 5. Fruto de Cacao

Fuente:(Luna&Cobos,2024)

2.2.2.6 Semilla

Las semillas también llamadas almendras están envueltas de pulpa de color blanco cremoso, de algunos sabores y olores como a nueces, floral, frutal y con grados de acidez, astringencia y dulzura, además las semillas son ricas en azúcar y muy jugosas gracias a una cubierta blanca que la cubre, está cubierta es conocida como mucilago, este mucilago es muy jugoso y azucarado, está formado por dos cotiledones que se componen de grasa, taninos, y otros compuestos que al alterarse se obtiene el sabor delicioso del chocolate. Las semillas varían en tamaño desde 1.2 a 3 cm de longitud. Dentro de las semillas se encuentran los cotiledones que pueden ser de color morado, violeta, rosado o blanco según la variedad de cacao. (Zambrano, 2015)



Imagen 6. Semilla de Cacao

Fuente: (ANECACAO, 2023)

2.2.3 Tipos de cacao que cultiva Ecuador

2.2.3.1 Cacao Nacional

Este cacao se conoce como fino y aromático, su calidad realmente es de otro nivel, este producto representa las raíces de nuestro país teniendo un significado de tradiciones y por sus propiedades tan especiales es conocido ya mundialmente por sus grandes usos dentro de la industria de los dulces y chocolatería. Mundialmente esta variedad de cacao se distingue: granos comunes ("bulk beans" o basic beans"), que se utilizan para elaborar chocolates ordinarios y los granos finos ("flavour beans"). Estos granos son utilizados para la elaboración de chocolates especiales, cubrir postres

especiales. (Álava, 2020)

Este cacao nacional ha sido cuestionado en muchas oportunidades por diferentes investigadores, pues tanto por su forma y su genética además por su magnífico sabor considerando ponerlo en un grupo aparte. Se caracteriza por la formación de sus almendras muy grandes y sus cotiledones levemente marrones, cuando se cuidan estrictamente se produce un chocolate espectacular por su delicioso aroma delicado y pronunciado a flores.

Los árboles de esta variedad tienen una altura considerable, las mazorcas que producen muy parecidas a los amelonados, pero sus surcos son más marcados, además sus semillas se llegan a fermentar entre 4 a 5 días y tienen un aroma especial. (Bajaña, 2014)



Imagen 7. Cacao Nacional

Fuente: (Luna&Cobos, 2024)

2.2.3.2 Cacao CCN-51

Este tipo de cacao se caracteriza por presentar un color rojo en sus inicios de crecimiento y lo conserva cuando llega al estado adulto. Se conoce que cuenta con un porcentaje alto de grasas, además tiene una gran potencia de producción pues puede ser cuatro veces mayor a las comunes producciones. (Terenzi, 2017). El tipo de cacao CCN-51 pertenece a una clonación, variedad de cacao nombrada con número y letras producto de la investigación, este tipo de cacao tiene mazorcas de coloración rojiza-morada cuando están jóvenes y de color rojo naranja cuando se encuentran en estado adulto, tiene propiedades muy valiosas entre ellas resalta que es muy fuerte para resistir enfermedades por lo que es elegido en la mayoría de casos por su excelente

productividad y excelencia. (Guerra, 2019a)



Imagen 8. Cacao CCN-51

Fuente: (ANECACAO, 2023)

2.2.4 Aplicaciones del cacao

El cacao tiene muchas utilidades en el campo de la industria alimentaria principalmente, donde se aprovecha todos sus derivados, para obtener otros productos principalmente para la elaboración de bocadillos finos, también como derivados podemos obtener derivados líquidos para la elaboración de otros subproductos.

2.2.4.1 Cáscara

Esta parte de cáscara de cacao tiene gran valor debido a que se usa para elaborar alimento en polvo para ganado, de igual manera se usa para obtener abono orgánico para el uso agropecuario.

2.2.4.2 Polvo

Este derivado se obtiene cuando las semillas de cacao se comprimen y se obtiene el polvo de cacao, este producto es muy bajo en grasa, a partir de este producto se elaboran postres, bocadillos.

2.2.4.3 Licor

El licor es una pasta muy untuosa que se obtiene cuando al cacao se lo somete a molienda, este producto tiene un gran uso en la industria del chocolate y también para elaborar bebidas, sirve como base para preparar otros productos como la torta, polvo y manteca.

2.2.4.4 Manteca de cacao

Un producto tan comercial y popular es la manteca de cacao, esta se obtiene de los granos de cacao que han sufrido un proceso de fermentación, es un producto rico en grasa saturada y su aplicación es muy cotizada en la industria cosmética para elaborar mascarillas, jabones, pomadas y en la industria farmacéutica. (Guerra, 2019b)

2.2.4.5 Mucílago de Cacao

El mucilago de cacao es una sustancia hialina que se obtiene de la presión ejercida sobre los granos de cacao y tiene muchísimos usos sobre todo para elaborar bebidas alcohólicas de gran sabor y aroma, desfavorablemente en muchos sitios es considerado como un desecho.(Guerra, 2019b).

2.2.5 Mucílago o pulpa de cacao

Es una sustancia untuosa que este alrededor de las semillas de cacao dentro de la vaina, que sale de la mazorca de cacao como resultado de la fricción de sus granos, el número de semillas o almendras que tiene una mazorca de cacao es aproximadamente entre 25 a 50 semillas, así también su forma, tamaño son variables. El mucilago de cacao es comestible tanto para seres humanos como para animales, además de su agradable sabor. La pulpa de cacao es muy importante para la fermentación, por lo general hay una gran cantidad de pulpa en mayor proporción a la necesaria, ese exceso de pulpa tiene un sabor exquisito, esta pulpa ha sido utilizada para obtener una gran cantidad de productos deliciosos como jaleas, vinagre, bebidas alcohólicas.

La pulpa de mucilago está formada por: células esponjosas parenquimatosas, que poseen células formadas se savia saturadas de azúcares (10-13%), pentosas (2- química como almacenadores de agua por su capacidad de guardar líquidos, impidiendo así que la planta pierda agua de manera extrema y ayudando al desarrollo. En las plantas los mucilagos tienen vital importancia ya que funcionan como depósitos de agua gracias a su capacidad de retención, evitando así la deshidratación y favoreciendo la germinación. Cuando son muy abundantes, pueden fluir al exterior y por desecación en contacto con el aire se forman gomas.(Guerra, 2019).



Imagen 9. Mucilago de Cacao

Fuente: (Carvajal, 2022)

2.2.6 Composición del mucílago del cacao

El mucílago de cacao es uno de los subproductos del cacao al que no se le ha dado el debido interés, ya que de conocer sus beneficios se puede llegar a obtener toneladas por año al realizar una adecuada recolección. Por su composición y propiedades fisicoquímicas puede ser explotado en muchas industrias, principalmente en la industria alimentaria. Los autores de varios estudios basados en la composición del mucílago coinciden en que los porcentajes de sus componentes varían según la región de donde se cultiva y también a la variedad, además el mucílago de cacao es rico en azúcares.(Cornejo, 2022).

Tabla 2. Azúcares del mucilago de cacao.

Azúcares del mucilago de cacao	
Parámetros	Variedad Nacional (% m/v)
Fructosa	4.45
Azúcares totales	11.70
Glucosa	6.91
Sacarosa	0.34
Azúcares reductores	11.36
Lactosa	0.00

Fuente: (Moreira, 2019)

Tabla 3. Composición química del mucilago de cacao

Composición química del mucilago de cacao	
Componente	Base húmeda (% m/m)
Ácido cítrico	0.77 – 1.52
Agua	79.2 – 84.2
Cenizas	0.40 – 0.50
Azúcares	12.50 – 15.9
Proteína	0.09 – 0.11
Pectinas	0.9 – 1.19
<i>Nitrógeno total</i>	<i>0,11</i>
<i>Aminoácidos libres</i>	<i>0,15</i>
<i>Proteínas/ péptidos</i>	<i>0,57</i>
<i>Amonio</i>	<i>0,02</i>

Fuente:(Guerra, 2019)

2.2.7 Microbiología del cacao

Para que se lleve a cabo el proceso de la fermentación es indispensable la presencia de variedades de microorganismos que se encuentran en el ambiente, debido a que el cacao cuando se cosecha el cacao y se obtiene el mucílago se encuentra medianamente estéril, la presencia de los microorganismos permite la fermentación y con ello la formación de otros compuestos. (Moya & Gómez, 2020).

2.2.7.1 Bacterias lácticas

En la segunda fase de fermentación intervienen las bacterias lácticas, las que actúan con los azúcares que quedan de la primera fase además interactúan con el alcohol etílico presente en la producción del ácido láctico. Esta segunda fase de fermentación se activa al día dos o tres desde que se inició la fermentación. En esta fase tenemos la participación de las bacterias de los

Lactobacillus: Lactobacillus collonides , Lactobacillus plantarum, fermentum, también se conoce el hallazgo de otras bacterias: Leuconostoc pseudoficulneum y Leuconostoc pseudomesenteroides. (Moya & Gómez, 2020).

2.2.7.2 Bacterias acéticas

Las bacterias acéticas se conocen por sus efectos desfavorables al estar presentes en fermentos de uva, hay que resaltar que son de vital importancia cuando de elaborar vinagres se trata. Estas bacterias son aerobias, es decir su metabolismo solo se activa si hay oxígeno. En presencia de alcoholes y aldehídos producen oxidación rápida. Estas bacterias por mucho tiempo se han considerado como bacterias molestosas por su manifestación de crecimiento en los medios de cultivo.

La caracterización de las bacterias acéticas se ha obtenido antiguamente sólo por pruebas bioquímicas y fisiológicas y se ha podido identificar los géneros: Gluconobacter y Acetobacter, sin embargo, con los avances moleculares ha sido posible identificar al menos 13 géneros y cerca de 70 especies.(Gerard, 2015).

2.2.7.3 Bacterias esporuladas

Algunas bacterias pueden producir bacterias en su interior y cuentan solo con una espora por cada célula, su forma es redondeada u ovoide, tienen una dimensión aproximada entre 0.2 y 2 u y localizarla dentro de la bacteria algunas veces no es posible. Esa capacidad de formar esporas de algunas bacterias se denomina esporulación, siendo ese un proceso muy complejo. Cuando hay condiciones favorables de alimentación, humedad y temperatura el esposo sufre un severo cambio denominado germinación, este proceso concluye cuando se libera un esposo vegetativo que puede reproducirse. (M. del R. Pascual, 2005).

En esta etapa se da el desarrollo de las bacterias del género Bacillos, aquí las altas temperaturas ayudan al crecimiento de este tipo de bacterias, las mismas que dan lugar a muchas enzimas que son capaces de reaccionar a los productos que por lo general son los encargados de dar sabores y de

aromas no deseados en el cacao. (R. A. Pascual & Calderón, 2005)

2.2.8 Fermentación del mucílago de cacao

Para este proceso de fermentación ya sean bacterias, levaduras o con enzimas son las que permiten que esto suceda, lamentablemente en muchos lugares no se aprovecha el mucilago y se desecha, sin embargo, en otros sitios se ha dado valor a la pulpa de cacao. Los países de Sudamérica incluido Ecuador son muchos los usos que se le da al mucilago de cacao especialmente en repostería

Los jugos de cacao han sido lo nuevo que se ha introducido en los mercados por parte de las empresas aprovechando así las maravillosas bondades del cacao, también se lo encuentra en estado pulverizado. Las variedades de cacao que se cultivan en países como Brasil, Ecuador y Filipinas se consideran unas de las más jugosas.(Goya, 2013)

2.2.9 Las Levaduras

La palabra levadura hace referencia al grupo de hongos que son unicelulares, donde las hifas no siempre se encuentran, además cuentan con una fase sexual, algunas de estas levaduras a las que aún no se detalla su fase sexual son llamadas formas parecidas a levaduras también llamadas *yeastlike*, su reproducción se lleva a cabo por gemación. En cuanto al sitio taxonómico este grupo último se ubica en la división Deuteromycota de la clase Blastomycetes o Levaduras. (Mendoza, 2005)

En el proceso de fermentación las levaduras intervienen sobre todo más en los primeros días, el metabolismo de estas es anaerobio, en este proceso las levaduras consumen los azúcares y el almidón que están presentes en el mucilago y que al interactuar dan como resultado el gas dióxido de carbono y alcohol etílico. De la misma manera el ácido cítrico que se encuentra en el mucilago de cacao se consume y hace una baja en el pH. Los géneros de levaduras que más se han encontrado en el proceso de fermentación del mucilago de cacao son *Saccharomyces*, *Kloeckra*, *Cándida*, *Hansenula*, *Pichia*, *Rhodotorula*. (Nielsen, Jakobsen, & Jespersen, 2010)

2.2.10 Uso de levaduras en la fermentación

El proceso de fermentación es la acción natural por la que los nutrientes se convierten por el efecto de la acción bioquímica de enzimas producidas por los microorganismos, proceso que por lo general puede ser sin la presencia de oxígeno, es decir su desarrollo se daría sin la presencia de oxígeno. En este proceso los microorganismos, ya sean bacterias y hongos, por ejemplo, las levaduras que hacen que el pan aumente de volumen debido a la producción de dióxido de carbono. Las levaduras son los microorganismos con poder fermentativo más utilizado y muy conocido, pero existen muchas variedades de cepas de levaduras, utilizadas en el mundo para la fabricación de vinos y cervezas, también para producir etanol, entre otros productos para fines industriales.(Vázquez & Dacosta, 2007).

2.2.11 Propiedades de la levadura de cerveza

Siendo la cerveza la bebida con más consumo a nivel mundial, así también la forma de fabricación es maravillosa, ya que se encuentra formada básicamente por cuatro ingredientes como la cebada, agua, lúpulo y levaduras, donde cada ingrediente aporta para que al final la cerveza tenga un magnífico sabor, así como los aromas. En la fermentación las levaduras convierten los azúcares que se encuentran en los cereales a etanol y liberan dióxido de carbono, durante esta transformación hay una generación de muchos metabolitos que tienen mucho que ver con el sabor final de la cerveza. Los diferentes metabolitos que se encuentran tienen mucho que ver con el aspecto, el sabor y el olor de la cerveza.

En la industria cervecera se emplean grandes cantidades y tipos de levaduras, con estas diferentes levaduras nacen dos familias de cervezas como son, las cervezas de alta fermentación (ales) y las de baja fermentación (lager), la *Saccharomyces pastorianus* es la levadura de mayor elección cuando se obtienen cervezas ales es decir de alta fermentación, los resultados del uso de esta levadura es cervezas suaves, mientras que la *Saccharomyces cerevisiae* es la levadura de mayor uso cuando se obtienen cervezas lagers se trata, dando como resultado cervezas con sabores más potentes con aromas fuertes y grado alcohólico superior.(Peralta, Sauka, Marozzi, Del Valle, & Palma, 2021)

Las levaduras aportan sabores y aromas únicos a los alimentos que fermentan,

además de ayudar a hacer más intensos los sabores y si se disminuye la acidez las levaduras ayudan a hacer más ligeros los sabores especialmente se los vinos blancos.(Burini, Eizaguirre, Loviso, & Libkind, 2021) (Peralta et al., 2021).

2.2.12 *Saccharomyces cerevisiae*

Las levaduras son microorganismos unicelulares, de tipo hongos que fermentan los azúcares presentes y transforman en alcohol. Estas levaduras son ovaladas, algunas de forma alargada, así también hay que saber sobre las levaduras que no todas producen nitrógeno. Etimológicamente proviene de saccharo que quiere decir azúcar, myces proviene de hongo y cerevisiae que hace referencia a la cerveza. Su principal función dentro de un proceso de fermentación es aprovechar los azúcares que hay en una muestra y transformarlo en etanol y CO₂. (R. A. Pascual & Calderón, 2005)

Esta levadura aislada, sus colonias tienen una coloración de aspecto cremoso, húmedo, brillantes, con bordes irregulares, las células suelen ser esferoidales, cilíndricas, crecen de manera óptima entre 25 a 30 °C. Es la levadura más utilizada en los procesos industriales de fermentación, siendo considerada como una pionera dentro del desarrollo económico, se la puede encontrar de manera natural en el suelo y plantas, así también el aparato genital y tracto intestinal, también usada para la producción de vitaminas y proteínas que se utilizando tanto en el ser humano como en animales.(R. A. Pascual & Calderón, 2005).



Imagen 10. *Saccharomyces cerevisiae* al microscopio

Fuente:(Mendoza, 2005)

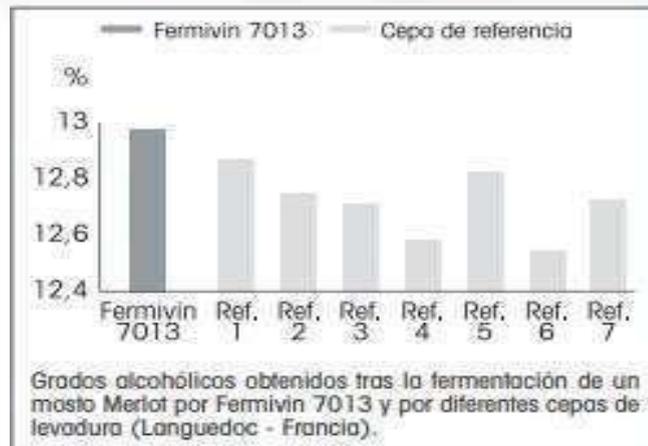


Imagen 12. Comparación de Fermivin® 7013 en relación de azúcares – grado alcohólico

Fuente: (OENOBANDS SAS, 2017)

La variedad genéticamente modificada de Fermivin® 7013, fue seleccionada y validada en el año 1970 por el Instituto Nacional de Investigación Agraria francés- INRA, en Corbières, Languedoc de Francia y fue comercializada como Levadura Seca Activa- LSA desde 1977.

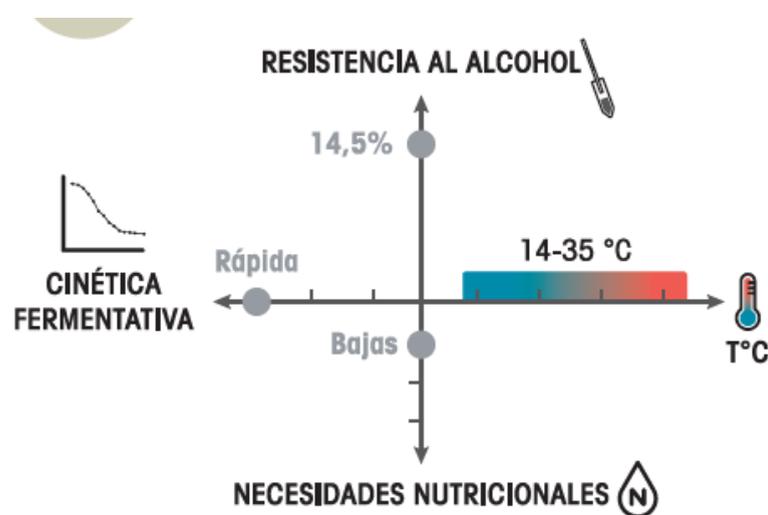


Imagen 13. Propiedades Enológicas de *Saccharomyces cerevisiae* Fermivin® 7013.

Fuente: (OENOBANDS SAS, 2017)

Tabla 4. Características del metabolismo de FERMIVIN® 7013.

CARACTERÍSTICAS DEL METABOLISMO DE FERMIVIN® 7013 <i>Saccharomyces cerevisiae var. Cerevisiae</i>	
Producción de SO₂	< 10 mg/l
Producción de glicerol	6 a 8 g/l
Producción de acidez volátil	< 0.18 g/l
Producción de acetaldehído	< 20 mg/l
Producción de H₂S	Baja
Actividad HCDC*	80%
Factor Killer	Neutro
* HCDC = Actividad Hidroxicinamato Descarboxilasa	

Fuente:(OENOBANDS SAS, 2017)

2.2.14 La fermentación alcohólica

Es una reacción bioquímica donde se puede transformar los azúcares contenidos en un sustrato en etanol y CO₂, la ecuación que detalla dicho proceso es:



Los encargados de esta reacción de transformación son las levaduras, la más utilizada es *Saccharomyces cerevisiae*, sin embargo, también existen otro tipo de hongos y levaduras utilizados para la producción de etanol como *Zymomonas mobilis* pero que a nivel de industrias no se utilizan frecuentemente.

Desde el punto de vista estequiométrico es un cambio simple, los acontecimientos secuenciales que se producen hasta que se llega a transformar la glucosa por lo general en 2 moléculas de alcohol y 2 moléculas de CO₂ es un complejo proceso, porque la levadura utiliza el azúcar y demás compuestos presentes necesarios para su reproducción. Este proceso de transformación se puede calificar el rendimiento biomasa/producto, también el rendimiento producto/ sustrato (Vázquez & Dacosta, 2007).

- Productividad biomasa/sustrato (Y_{x/s}): cantidad de levaduras producidas

por la cantidad de sustrato consumido.

- Productividad sustrato/producto (Y_p/s): cantidad de productos sintetizados por la cantidad de sustrato consumido.

Este rendimiento o productividad teórica estequiometría para la transformación de glucosa en etanol es 0.511 g/etanol y 0.489 g /CO₂ por gramo de glucosa. Estos valores establecidos fueron obtenidos por Gay Lussac, para lograr este rendimiento no es nada fácil, porque como ya se detalló la levadura necesita de la glucosa para producir otros metabolitos. Experimentalmente el rendimiento puede variar el 90 % a 95 % del valor teórico, de 0.469 a 0.485 g/g.). Otro valor importante es el rendimiento (g/h/l), el cual representa la cantidad de alcohol etílico producido en la unidad de tiempo y el volumen, todo lo mencionado se establece con relación a la fase de estudio y a la forma de funcionamiento del fermentador o también conocido como biorreactor.(Vázquez & Dacosta, 2007).

2.2.15 Biorreactor

Los biorreactores son contenedores por lo general cilíndrico de vidrio o acero inoxidable, donde se permite agregar sustancias, nutrientes, así también que permiten extraer sustancias para hacer mediciones rápidas. Este equipo es indispensable para que se lleve a cabo la fermentación alcohólica. En la actualidad existen biorreactores a nivel industrial de distintos costos y diseños, esto depende de los recursos económicos y de la necesidad de aplicación de este equipo, incluso se pueden hacer biorreactores manuales.(Vázquez & Dacosta, 2007).

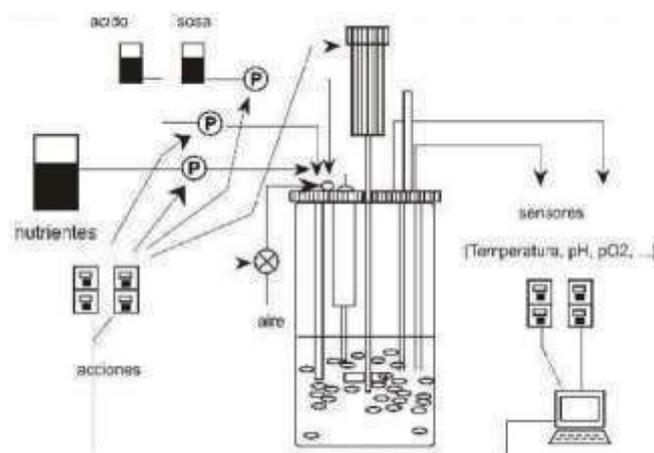


Imagen 14. Modelo de Biorreactor

Fuente:(Vázquez & Dacosta, 2007)

2.2.16 Bioetanol

El bioetanol es conocido también como etanol, alcohol etílico, es una sustancia líquida y su fórmula química es C_2H_5OH , tiene múltiples usos, pero resalta su uso en la gasolina para potenciar la gasolina. El etanol se obtiene por lo general de la fermentación de los azúcares presentes en la caña de azúcar y también de diversas materias primas de origen orgánico. La adición de etanol en los combustibles tiene un impacto positivo en la disminución de los gases causantes del efecto invernadero.

Para producir bioetanol actualmente dependen de la cantidad de biomasa y de su composición química, se usan tres variedades de materias primas:

Que cuenten con gran cantidad de sacarosa como es el caso de las melazas, caña de azúcar y remolacha. Que tengan una gran concentración de almidones como la papa o el maíz. Que tengan gran cantidad de celulosa que hay en los residuos del campo agrícola. (Vázquez & Dacosta, 2007)

Tabla 5. Producción de bioetanol a partir de diferentes materias primas.

Producción de bioetanol a partir de diferentes materias primas			
Primera Generación			
Materia prima	Costo	Producción de bioetanol	Referencia
Papa	4,99 UDS/L	81,85 L de etanol/tonelada de papa	Lizarazo et al., 2015
Segunda Generación			
Melaza con cáscaras de banano		Melaza de banano 0,04%	
Melaza con cáscaras de naranja	No establece	Melaza de naranja 6,50%	Caballero Williams, 2017.
Melaza con cáscara de maracuyá		Melaza de Maracuyá 0,18%	
kg et/kg MP			
Tallo de plátano		0,259	
Cáscara de arroz		0,257	
Bagazo de caña		0,255	
Cáscara de piña		0,049	

Desechos de mango		0,034	
Cáscara de plátano		0,009	
		v/v, ml bioetanol obtenido/100 ml de fermento destilado	
Cáscaras de mandarina		3,8 ± 0,2%	
Maracuyá	No establece	4,2 ± 0,1%	Llenque-Díaz et al., 2020.
Hojas de eucalipto		4,7 ± 0,1%	
Mucílago de cacao CCN- 51	No establece	25,41 g/L	Noboa et al., 2019.
Pseudotallo del plátano	USD 1,56 con cogeneración USD 1,84 sin cogeneración	99,7% en peso	Rendón et al., 2015.

Fuente:(Macías, Pérez, & Torres, 2022)

La producción de biocombustibles es una forma económica y eficiente de reducir el impacto en el medio ambiente y obtener productos útiles para el bien social, ya que al disminuir la producción del CO₂ no afectaremos a la capa de ozono, siendo esto un impacto positivo, además de esta forma se contribuye a la generación de empleo y desarrollo industrial. Por lo que producir bioetanol de varias materias primas orgánicas, nos da a entender que Ecuador tiene otras caras no exploradas para mejorar la económica ya que mal manejo de sustancias consideradas como desechos orgánicos pueden ser aprovechadas beneficiando a la economía y al medio ambiente.

2.2.17 El Bioetanol en la actualidad

El bioetanol ha sido considerado una satisfactoria salida ante los desperdicios descontrolados que se generan a partir de las diversas actividades que el hombre realiza actualmente, es una opción positiva para la disminución de los gases que producen el efecto invernadero, ya que en esta última década la preocupación por los efectos negativos producto de la combustión de gasolina y demás combustibles fósiles ha aumentado.

Esta problemática se ha ido intensificando con el constante crecimiento de las

industrias, ciudades y por consecuencia de los medios de transporte. Ante esto, se genera una alerta de peligro, ya que según el tiempo avanza la contaminación también lo hace, y con ella, la calidad del aire y de la capa de ozono se ven deterioradas. Frente a este problema nace el bioetanol, un biocombustible renovable que promete ser la solución al alarmante problema ambiental que se vive hoy en día.

A partir del año 2010, Ecuador adquirió como una política de apoyo energético para utilizar gasolina que tenga un 10 % de etanol, esta medida en apoyo a reducir las emisiones de los gases que causan el efecto invernadero, sin embargo, actualmente la gasolina que se comercializa cuenta sólo con el 5% de etanol y solo en algunas ciudades del país.(Macias et al., 2022)

CAPÍTULO III: DISEÑO METODOLÓGICO

3.1 Tipo y diseño de investigación

Para el diseño de investigación experimental, se utilizó mucilago de cacao en una concentración de 17,0 Brix y con una variación de temperaturas para la fermentación de 15 °C, 25°C 30 °C, con la adición de 1 g por cada 500 ml de sustrato (mucilago de cacao) adicionando dos tipos de levaduras: *Saccharomyces cerevisiae* comercial y *Saccharomyces cerevisiae* tipo Fermivin® 7013 genéticamente modificada. Los tratamientos se realizaron por duplicado, además se manejaron muestras de control (sin adición de levadura).

Tabla 6. Diseño del experimento

Muestras	Temperatura (°C)	Tipo de Levadura*
T1	15	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
T2	25	
T3	30	
T4	15	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> tipo Fermivin® 7013
T5	25	
T6	30	
T7	15	Control
T8	25	
T9	30	

*1g/L d levadura

Fuente:(Luna&Cobos,2024)

3.2 La población y la muestra

3.2.1 Características de la población

La población utilizada para esta investigación fueron las mazorcas de cacao de variedad nacional o arriba cosechadas en la provincia de El Oro, cantón Machala en la finca de la Universidad Técnica de Machala, lugar donde dispone de cultivos de cacao.

3.2.2 Delimitación de la población.

Se procedió a seleccionar mazorcas que se encontraban aptas para cosechar, verificando su óptimo estado de madurez identificado por su coloración amarilla, y que se encuentren sin presencia de daño ya sea por picaduras de animales o por enfermedades propias de la planta.

3.2.3 Tipo de muestra

Para realizar la parte experimental de este trabajo se recolectó el mucílago de cacao de variedad nacional o arriba, el cual fue obtenido tras estrujamiento manual, a partir de las mazorcas de cacao (población), las cuales posteriormente han sido recogidas en un contenedor plástico para su traslado hacia los laboratorios donde se procedió a procesar la muestra y efectuar los respectivos análisis.

3.2.4 Tamaño de la muestra

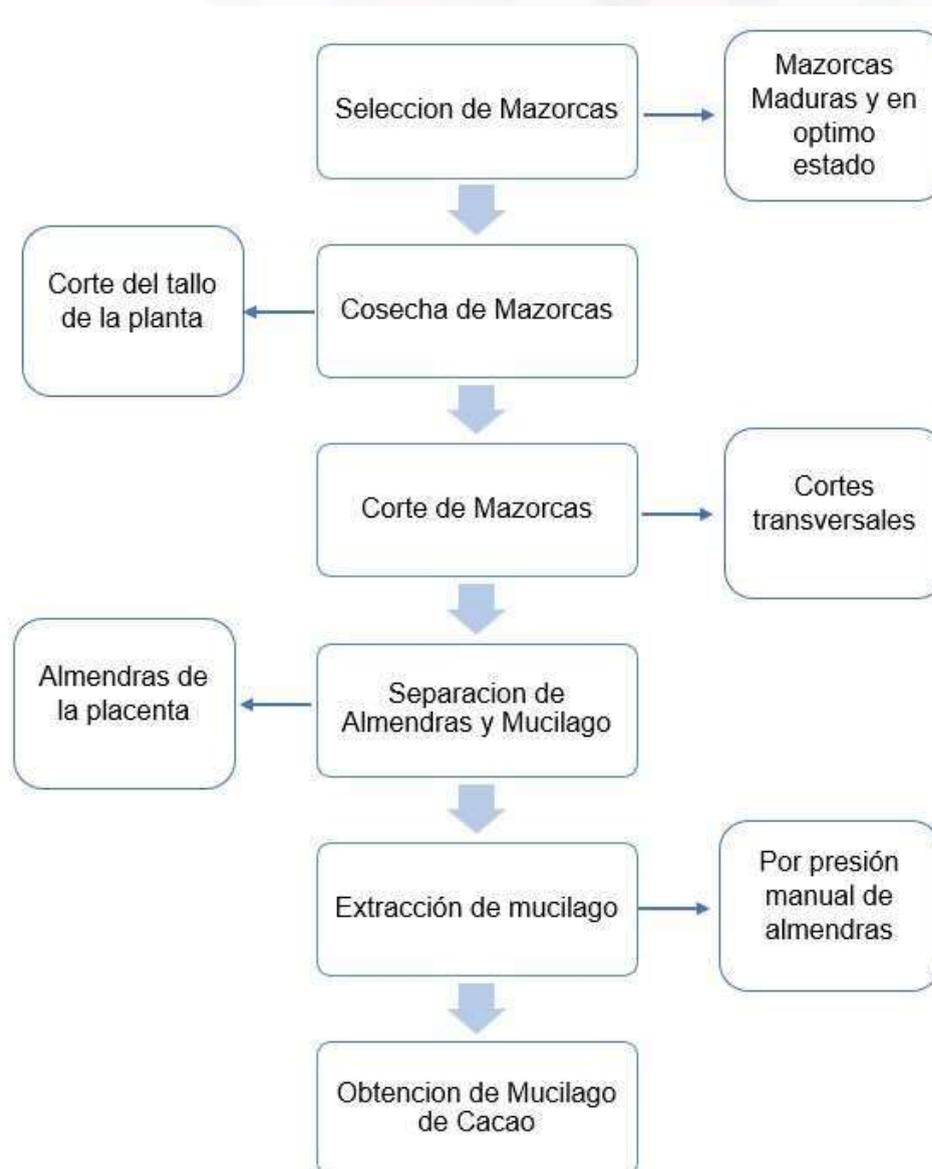
Se recolectó 10 litros de mucilago de cacao variedad nacional o arriba, cantidad con la cual fue utilizada para la esterilización, inoculación y análisis correspondientes.

3.3 Los métodos y las técnicas

3.3.1 Obtención del mucílago de cacao

Las mazorcas de cacao fueron seleccionadas de acuerdo al óptimo estado de maduración y condiciones aptas para cosechar (sin presencia de daño por picaduras de animales o por enfermedades propias de la planta), posteriormente fueron cortadas del tallo principal de la planta, y abiertas mediante un corte transversal, en condiciones asépticas los granos fueron colocados sobre mallas plásticas y mediante fricción/presión manual fue extraído el mucilago de cacao, el cual fue recolectado en un contenedor plástico para su posterior traslado. A continuación, se detalla en el siguiente esquema (*Imagen 15*).

Imagen 15. Proceso de extracción de Mucilago de Cacao.



Fuente:(Luna&Cobos,2024)

3.3.2 Caracterización del mucilago de cacao

Los análisis para la caracterización del mucilago del cacao se los realizó mediante los siguientes análisis, en los laboratorios de la Facultad de Ciencias Químicas y de la Salud de la Universidad Técnica De Machala (UTMACH), y en el Laboratorio de Química orgánica de la Universidad Superior Politécnica de Chimborazo (ESPOCH), los análisis se detallan a continuación (Tabla 7).

Tabla 7. Métodos de análisis de laboratorio.

Análisis	Método	Referencia
pH	Potenciometría	AOAC 981.12
Acidez	Volumetría	AOAC 942.15
Humedad	Gravimetría	AOAC 950.27
°Brix	Refractométrica	AOAC 931.12
Cenizas	Gravimetría	AOAC 940.26
Azúcares Reductores	Acido 3,5-dinitrosalicílico	AOAC 923.09
Análisis Elemental	Combustión	
Grupos Funcionales	FTIR	

Fuente:(Luna&Cobos,2024)

Medición de pH

Esta medición se realiza aplicando el método de potenciometría, para su medición se utiliza un pH-metro previamente calibrado, se sumerge el electrodo en un vaso de precipitación con 5 a 10 ml de la muestra, y se procede con la medición.

Medición de Acidez

Utilizando un matraz de 250 ml de capacidad el mismo que previamente haya sido tarado, se debe medir 5 ml de muestra y encontrar su equivalencia de acuerdo al peso, con una probeta se debe adicionar 50 ml de agua destilada, homogenizar y adicionar 3 gotas del indicador fenolftaleína, proceder a titular con una solución al 0.1 N de Hidróxido de Sodio (NaOH), hasta lograr la aparición del color rosa la cual será el indicador del punto final de titulación.

Medición de Humedad

Mediante método de calentamiento o termogravimétrico utilizando una estufa se calcula la pérdida de peso por la evaporación del agua presente en la muestra. Se

utiliza una capsula de porcelana previamente tarada, pesar 5 g de la muestra, colocar en la estufa a 105 °C por 4 horas hasta peso constante, posteriormente enfriar en desecación durante 20 minutos aprox. y pesar.

Medición de °Brix

Se realiza mediante un refractómetro digital, colocar unas gotas de muestra en el prisma y al presionar el botón de lectura el equipo proporciona el resultado.

Medición de Cenizas

Para este método se utiliza una mufla de calcinación, en la cual se ingresa un crisol de porcelana previamente tarado con 2 a 5 g de muestra, durante 4 horas a una temperatura entre 550° a 600° C, hasta peso constante, se incinera hasta conseguir un residuo de color blanco o grisáceo, se deja enfriar en un desecador durante 20 minutos aprox. y finalmente se procede a pesar.

Medición de Azúcares Reductores

Para este análisis se aplica el método del ácido 3,5-dinitrosalicílico, el cual consiste en utilizar tubos de ensayo y adicionar 0.5 ml de muestra, más 0.5 ml del reactivo de DNS (ácido 3,5-dinitrosalicílico). Posteriormente someter los tubos de ensayo a un baño de agua a una temperatura de 100°C durante 5 min aproximadamente. Enfriar a temperatura ambiente, añadir 5 ml de agua destilada, agitar y leer a 540 nm en espectrofotómetro. (Bello, Carrera, & Díaz, 2006)

Análisis Elemental

El análisis de los elementos: Carbono (C), Hidrógeno (H), Nitrógeno (N) y Azufre (S) del mucílago de cacao variedad nacional o arriba, se lo efectuó al utilizar un analizador elemental Flash EA1112, Serie- Thermo Finnigan. Previo del análisis se realizaron las curvas de control termo gravimétricas representadas a diferentes velocidades de calentamiento de 10, 20, 30 y 50° K / min, mediante un intervalo de temperatura desde 323 a 1173°K. (Ren Lim, Fui Chin, Abbas Jawad, & Ling Hii, 2016)

Análisis por espectroscopia infrarroja con transformada de fourier (FTIR)

El mucílago de cacao se caracterizó mediante FTIR para determinar la composición de los grupos funcionales de la muestra utilizando un espectrómetro JASCO FT/IR-4100 (Quito, Ecuador). El programa SpectraAnalysis realiza la

adquisición y tratamiento de datos y proporciona un valor numérico basado en la altura o área del pico en un rango de exploración de trabajo de 4000 a 580 cm⁻¹.

3.3.3 Proceso de Fermentación

El proceso de fermentación se lo efectuará durante 5 días a temperaturas de 15°C, 25°C y 30°C, utilizando levadura *Saccharomyces Cerevisiae* comercial marca "Instaferm®" y *Saccharomyces Cerevisiae* tipo Fermivin® 7013. Para las fermentaciones a temperaturas controladas: de 15°C se utiliza un equipo de refrigeración, a 30°C una estufa y 25°C (temperatura ambiente) en lugar fresco y seco. Posterior a la obtención del mucilago de cacao, se filtra mediante un lienzo dicho líquido exudado con el objetivo de eliminar partículas en suspensión y finalmente se esteriliza a una temperatura de 120°C durante 15 minutos con el objetivo de eliminar toda carga microbiana posiblemente presente en el mucilago de cacao.

Se realizó un control cada 12 horas realizando mediciones, de pH, °Brix y medición de concentración de etanol a las 96 horas a partir de la inoculación.

El proceso de fermentación se lo llevo a cabo en un diseño de biorreactor, utilizando un envase de vidrio ámbar sellado con corcho natural, en el centro es adaptada una llave de tres vías ANNTOM, en una de sus vías se acopló una manguera inmersa en agua cumpliendo la función de trampa de aire, permitiendo la liberación de CO₂ generado durante el proceso y evitando el ingreso de algún contaminante que perjudique la fermentación. En la otra vía se añadió una manguera para la toma de muestra (*Imagen 18*). Posterior a la adición del mucilago esterilizado en el envase, se realiza la inoculación de las levaduras.

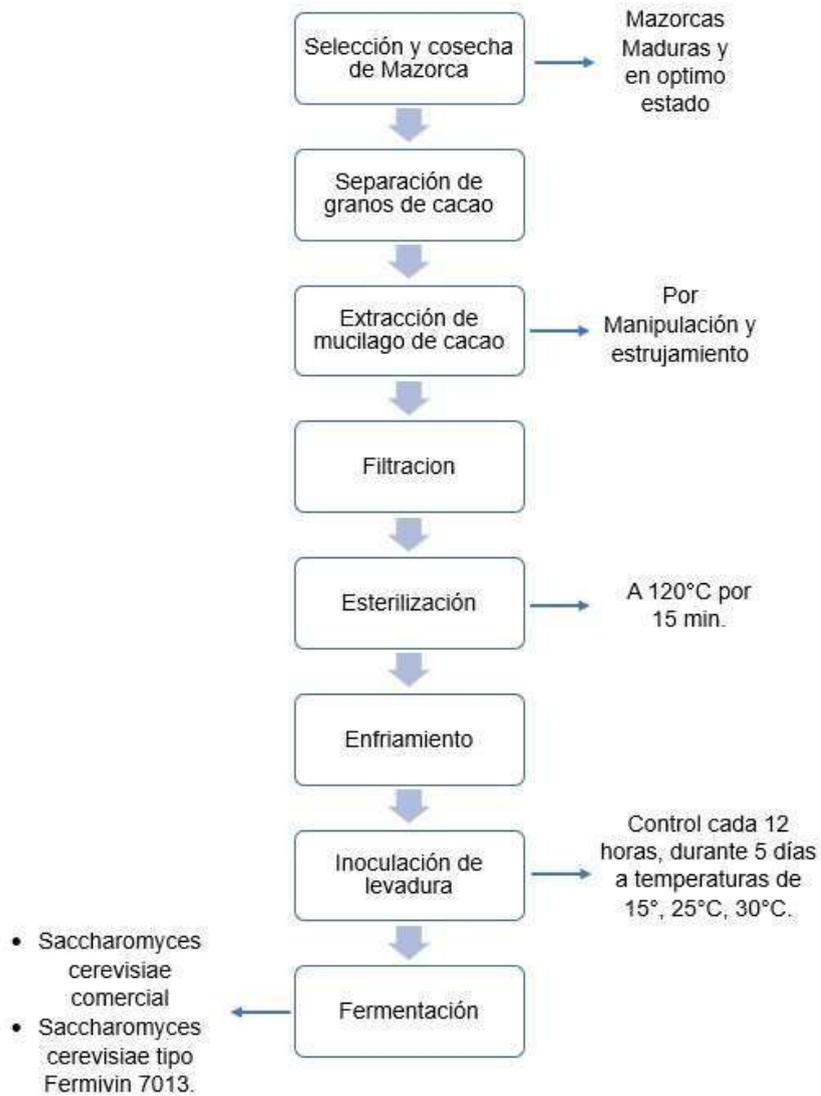


Imagen 16. Proceso de fermentación del Mucilago de Cacao

Fuente:(Luna&Cobos, 2024)

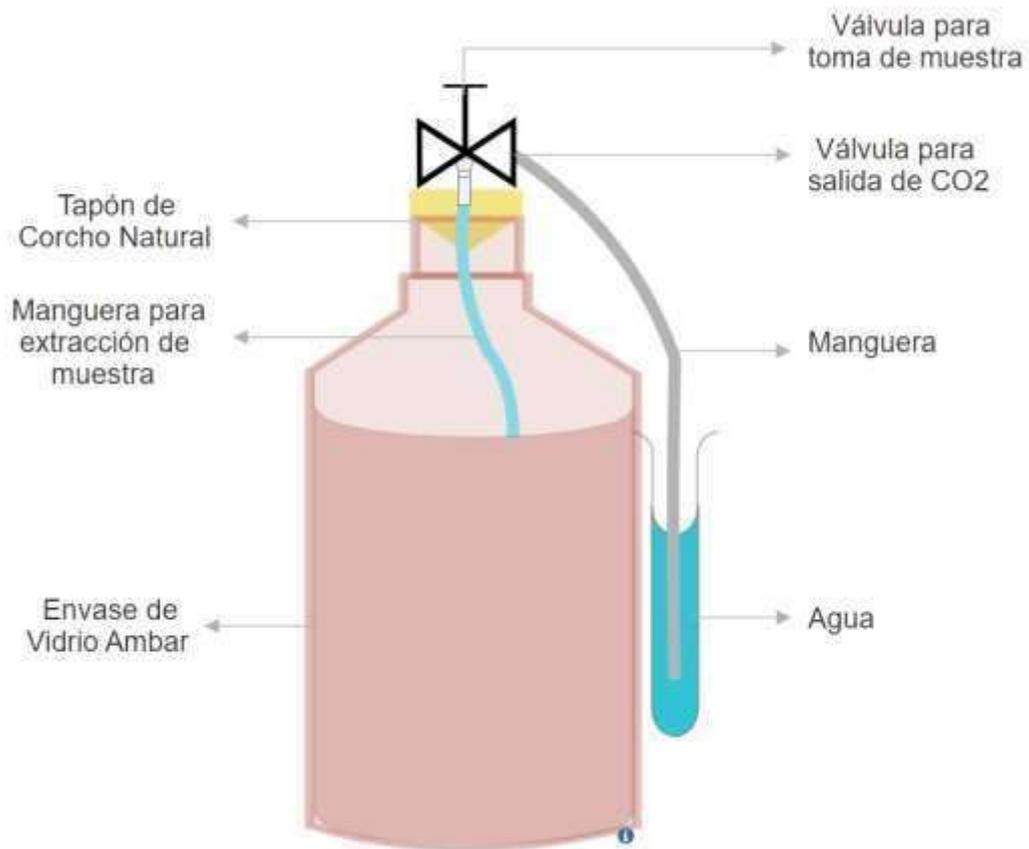


Imagen 17. Diseño de Fermentador

Fuente:(Luna&Cobos,2024)

3.3.4 Determinación de la Concentración de Etanol.

Este análisis se realizó utilizando el método de Refractometría. Con los valores obtenidos del control cada 12 horas de azúcares fermentables (°Brix). Se obtuvo la concentración de g/L de etanol, mediante la formulación:

$$g/L \text{ Etanol} = \left[\left(\frac{\text{Concentracion Inicial de Azúcares Fermentables}}{\text{Concentracion Final de Azúcares Fermentables}} \right) \times \left(\frac{\text{Peso molecular del Etanol}}{\text{Peso molecular de la}} \right) \right]$$

3.1 Procesamiento estadístico de la información.

Los datos obtenidos fueron procesados y graficados mediante programa Origin,

CAPÍTULO IV: ANÁLISIS E INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS

4.1 Análisis de los resultados

Caracterización Del Mucilago De Cacao Variedad Fino de Aroma (Arriba).

Los valores obtenidos mediante análisis físico químicos, se encuentra detallados a continuación.

Tabla 8. Análisis Físico-Químico y Composición Química del Mucilago de Cacao Variedad Nacional

Componente	Resultado*
°Brix	17,00±0,02
pH	3,48± 0,04
Azúcares Reductores (mg/L)	2150,4 ± 0.02
Cenizas (%)	0,32±0,10
Acidez (%)	1,75±0,50
Humedad (%)	83,43±0,07
<i>*Valores promedios de análisis por triplicado y su desviación estándar</i>	

Fuente:(Luna&Cobos,2024)

En la Tabla 8. se puede observar los resultados obtenidos de los análisis físicos químicos, en el caso de °Brix y Acidez se evidencia que datos similares fueron reportados en la investigación de (Hernández A & Rojas O, 2011), arrojando un valor de $16,60 \pm 0,20$. °Brix y $1,73 \pm 0,02$ % de Acidez. Así también en la investigación de (Espinoza & Mendieta, 2018) reportan 81,3 % de Humedad y 3,97 de pH.

Sin embargo, los análisis en ambas investigaciones fueron realizados en mucilago de cacao de variedad CCN51, por lo que se puede determinar qué datos de caracterización de este sustrato se pueden ver afectados por factores como el tipo de variedad de cacao, y el estado o grado de madurez de las mazorcas de cacao.

Tabla 9. Composición Elemental del Mucilago de Cacao Variedad Nacional

Componente	Resultado*
Nitrógeno (%)	0,85
Hidrogeno (%)	5,46
Azufre (%)	<0,05
Carbono (%)	44,92
*Valores promedios de análisis por triplicado y su desviación estándar	

Fuente:(Luna&Cobos,2024)

En la Tabla 9. Se puede visualizar los resultados obtenidos. En la actualidad no existe escasa información e investigaciones acerca de la composición elemental de dicho sustrato. El único elemento corroborado ha sido el Nitrógeno, ya que en la investigación de (Mejía & Aguello, 2000) reporta valores similares.

En el Grafico 1. se muestra el análisis FTIR realizado del mucilago de cacao. Como se puede notar existen tres picos característicos en el espectro obtenido a 3328 cm^{-1} , 1643 cm^{-1} y 1045 cm^{-1} que coinciden con trabajos similares reportados en literatura. La banda de absorción a 3328 cm^{-1} , se atribuyen a vibraciones de estiramiento de grupos O-H, los cuales pueden unirse con moléculas de agua y producir humedad ligada a los componentes del mucílago. Además, la banda de absorción de 1643 cm^{-1} evidencian la presencia de vibraciones de estiramiento de grupos carbonilo (C=O) correspondiente a moléculas de carbohidratos presentes en el mucílago de cacao y finalmente el pico de 1045 cm^{-1} corresponde a vibraciones de estiramiento asimétricas del grupo carboxilo (C-O), lo que probablemente se debe a la pectina presente en esta materia prima, que contribuye a la viscosidad del mucílago. Por tanto, este análisis corrobora la potencialidad de esta biomasa usada, como sustrato rico en azúcares para su conversión en etanol mediante el uso de dos tipos de levadura realizado en este trabajo.

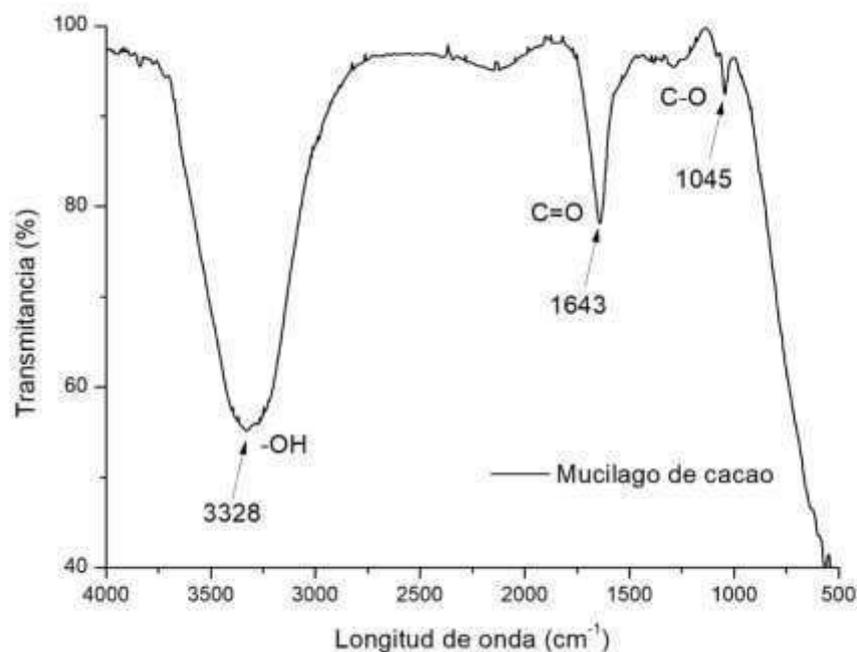


Gráfico 1. Análisis FTIR del Mucilago de Cacao Variedad Nacional

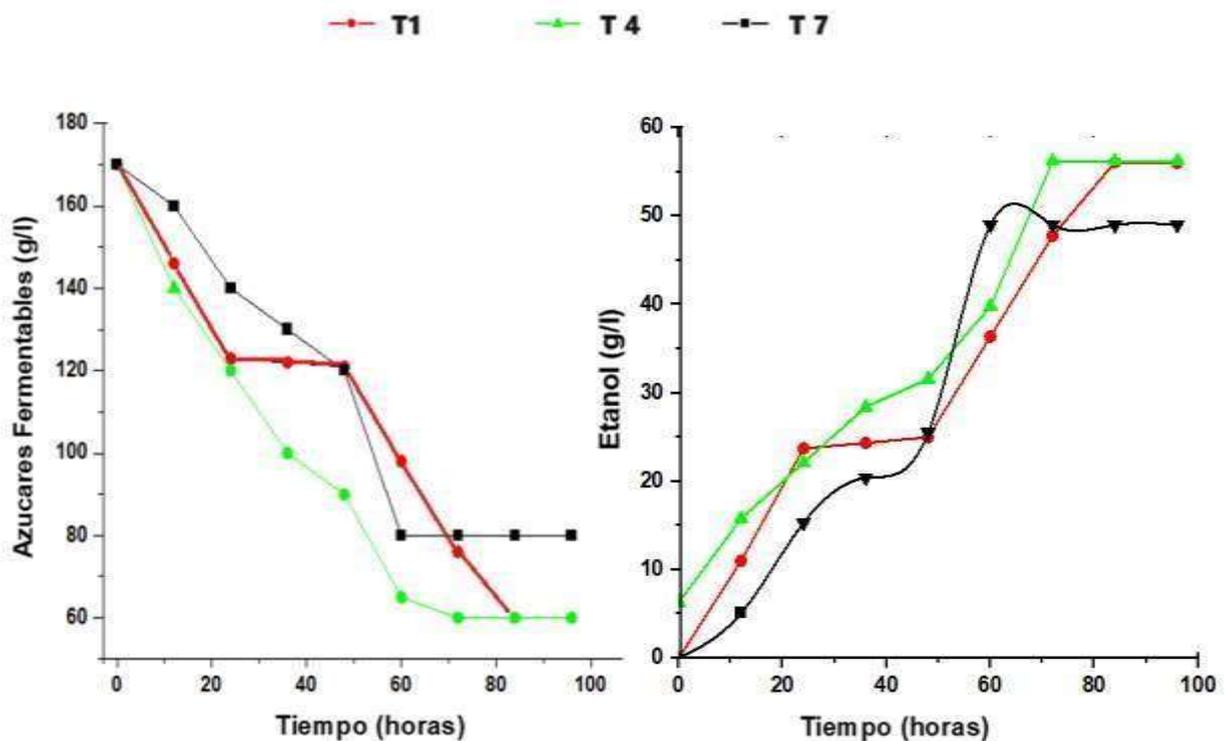
Fuente:(Luna&Cobos, 2024)

Proceso de Fermentación

En este trabajo experimental se realizó 9 tratamientos para la producción de etanol a partir del mucílago de cacao de variedad nacional, las variables a comparar son entre dos tipos de levaduras sometidas a 3 diferentes temperaturas de fermentación: 15°C, 25°C y 30°C, las cuales según investigaciones se encuentran en el rango de temperatura óptima de desarrollo y reproducción de la levadura *Saccharomyces cerevisiae*. Los resultados obtenidos se encuentran graficados a continuación:

En el Grafico 2. Se puede visualizar que al finalizar la fermentación (a las 96 horas), el T1 y T4 obtuvieron 60 g/L de Azúcares fermentables, es decir una reducción del 67% y una producción de 56,10 g/L de etanol. El T7 obtuvo 80 g/L, una reducción del 53% de sus Azúcares fermentables y una producción de 45,90 g/L de etanol. En la actualidad existe escasa referencia de producción de bioetanol a temperaturas bajas, por lo que se sugeriría en futuras investigaciones aplicar temperaturas inferiores a 25°C, para evaluar el resultado de concentración de

etanol vs tiempo de reacción.



(●) Tratamiento 1: *Saccharomyces Cerevisiae* comercial marca "Instaferm®"; (▲) Tratamiento 4: *Saccharomyces Cerevisiae* modificada Fermivin® 7013; (■) Tratamiento 7: Sin adición de levadura

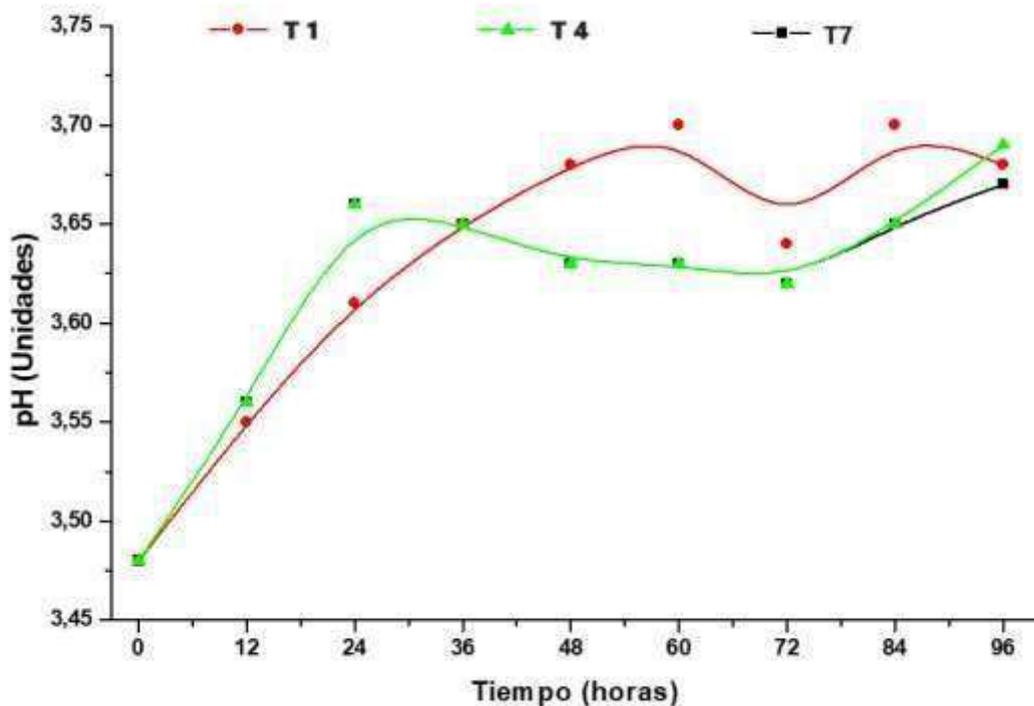
Gráfico 2. Comparación de los azúcares fermentables y etanol durante la fermentación a temperatura de 15 °C.

Fuente: (Luna&Cobos, 2024)

El gráfico 3. se muestra la variación de pH durante el proceso de fermentación de 3 diferentes inóculos a una misma temperatura, se visualiza que en los 3 tratamientos hubo un incremento de pH. El T1 obtuvo 3,70, el T4 alcanzó un pH de 3,68; mientras que el T7 un 3,67.

En la investigación realizada por (Pacheco, 2020) en la cual se obtuvo una bebida alcohólica a partir del mucilago de cacao mediante fermentación, determinó que la temperatura óptima para el proceso de fermentación es no mayor a 27°C sin embargo, el control de pH durante el proceso no tuvo mayor variación, en los 8 días de control se mantuvo un pH de 4, lo cual difiere de la investigación de (Cardenas, 2017), ya que se manifiesta que durante el proceso de fermentación existirá un incremento progresivo de pH y una disminución en la acidez.

Por lo que se deberá evaluar en futuras investigaciones la relación pH vs Acidez durante el proceso de fermentación

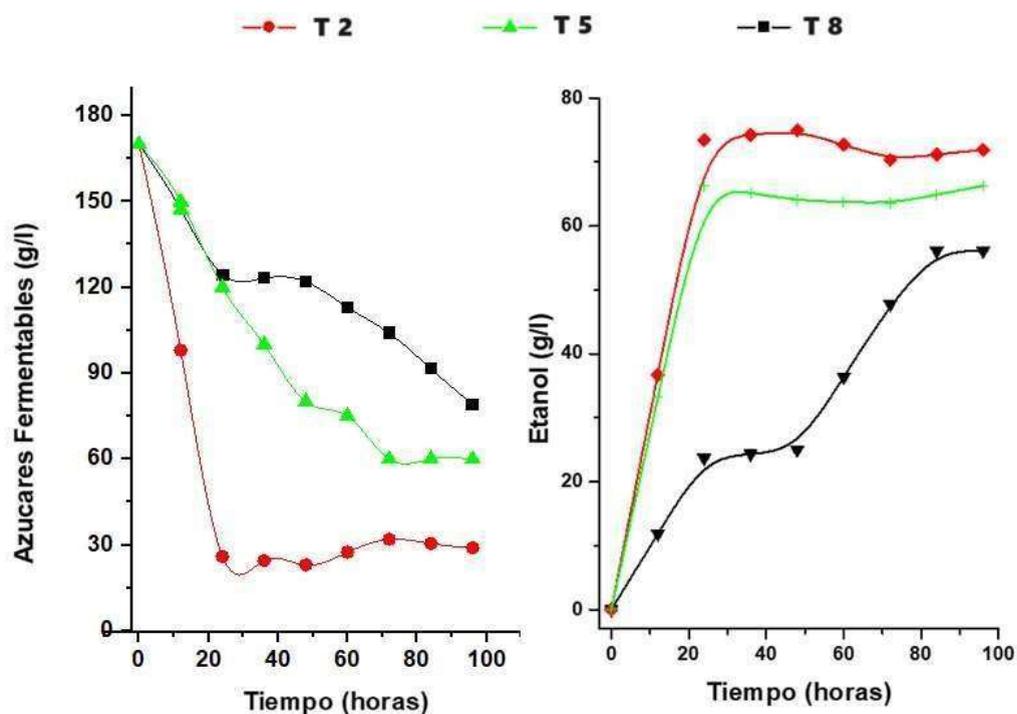


(●) Tratamiento 1: *Saccharomyces Cerevisiae* comercial marca "Instaferm®"; (▲) Tratamiento 4: *Saccharomyces Cerevisiae* modificada Fermivin® 7013; (■) Tratamiento 7: Sin adición de levadura.

Gráfico 3. Comparación del pH durante la fermentación a temperatura de 15°C.

Fuente:(Luna&Cobos, 2024)

En el Grafico 4, se puede observar que en el T2 existió una disminución de 170 g/L a 29 g/L de azúcares fermentables, es decir una reducción del 83% una vez culminado el tiempo de control (a las 96 horas), además se obtuvo un 71,91 g/L de concentración de Etanol, en el caso del T5 los azúcares fermentables disminuyeron a 60 g/L, una reducción del 65%; finalmente el T8 sus azúcares fermentables disminuyeron de a 79 g/L, una reducción del 54%. Por lo cual de los 3 tratamientos en el que se generó mayor cantidad de etanol fue el T2, a las 12 horas obtuvo una reducción del 42 % de sus azúcares, siendo el tratamiento que obtuvo mejor tiempo de reacción. Valores similares fueron reportados en el trabajo experimental de (Anvoh, Zoro Bi, & Gnakri, 2009).



(●) Tratamiento 2: *Saccharomyces Cerevisiae* comercial marca "Instaferm®"; (▲) Tratamiento 5: *Saccharomyces Cerevisiae* modificada Fermivin® 7013; (■) Tratamiento 8: Sin adición de levadura.

Gráfico 4. Comparación de los azúcares fermentables y etanol durante la fermentación a temperatura de 25 °C.
Fuente: (Luna & Cobos, 2024)

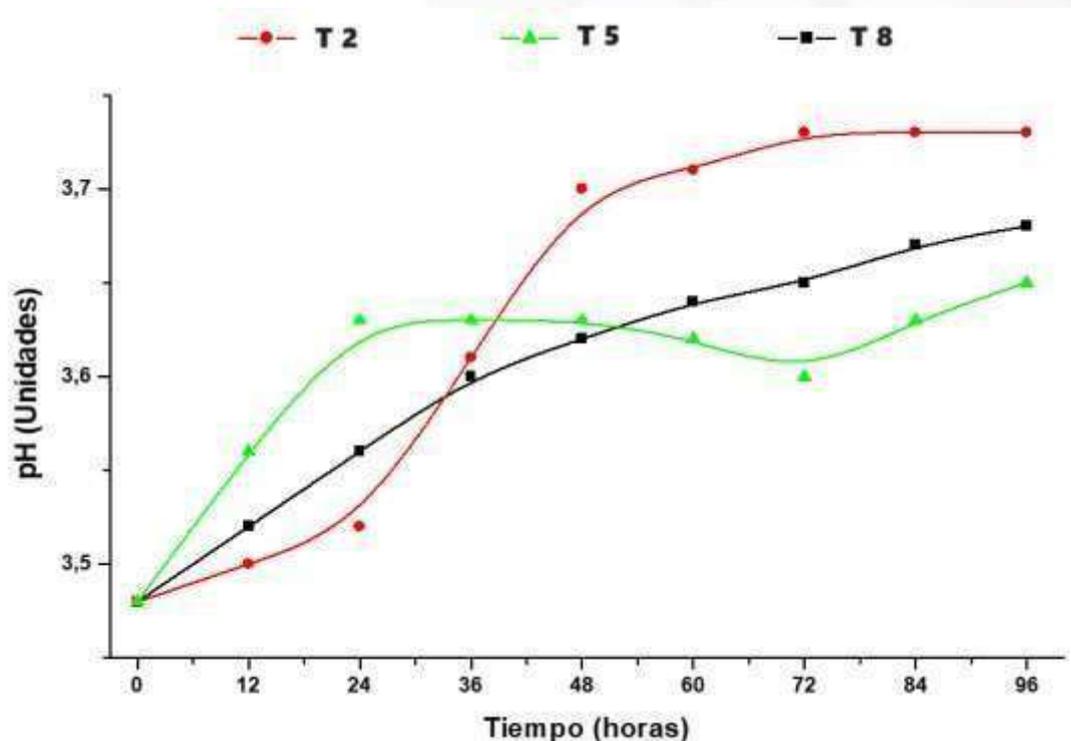
El gráfico 5. se muestra la variación de pH durante el proceso de fermentación de 3 diferentes inóculos a una misma temperatura, se visualiza que en los 3 tratamientos hubo un incremento de pH. El T2 obtuvo 3,68, el T5 alcanzó un pH de 3,73, mientras que el T8 un 3,65.

Sin embargo, se puede observar que el T8 tuvo un incremento más estable y regular.

En resultados preliminares del trabajo realizado por (Espinoza & Mendieta, 2018) se obtuvo una variación brusca y aumento no paulatino del pH durante el proceso de fermentación, similar al T5 de la presente investigación, por lo que dichos autores determinaron que el factor de esta condición es la reacción de acidez durante el proceso, por lo que se optó por aplicar un estabilizador de acidez (bicarbonato de sodio).

En la investigación de (Cardenas, 2017) en la cual se realizó una fermentación de mucilago de cacao variedad CCN51 a temperatura ambiente se determinó que el pH

en todos los tratamientos, tuvieron un incremento durante el transcurso del proceso de fermentación, se registra el mayor incremento de 3.08 a 4,07.



(●) Tratamiento 2: *Saccharomyces Cerevisiae* comercial marca "Instaferm®"; (▲) Tratamiento 5: *Saccharomyces Cerevisiae* modificada Fermivin® 7013; (■) Tratamiento 8: Sin adición de levadura

Gráfico 5. Comparación del pH durante la fermentación a temperatura de 25°C.

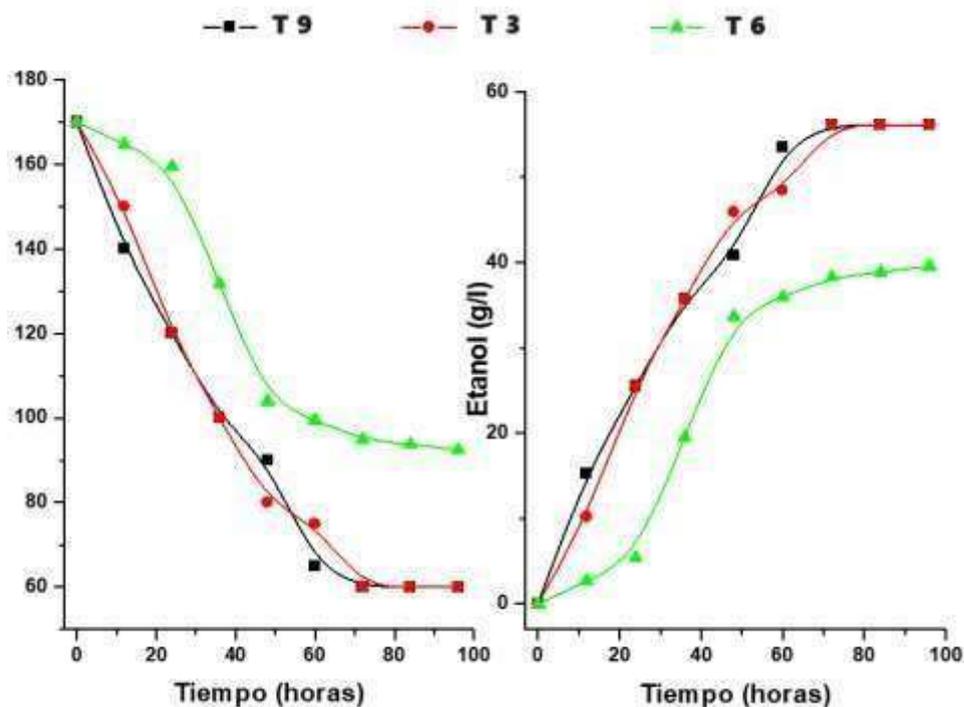
Fuente: (Luna&Cobos, 2024)

En el gráfico 6. Se evidencia que en los 3 tratamientos existe un consumo de Azúcares fermentables y un aumento directamente proporcional a la cantidad obtenida de etanol al transcurrir el tiempo de fermentación.

Al finalizar la fermentación (a las 96 horas), el T3 obtuvo 40 g/L, es decir una reducción del 76% de sus Azúcares fermentables y una producción de 66,30 g/L de etanol. El T6 obtuvo 92,50 g/L, una reducción del 46 % de Azúcares fermentables y una producción de 39,53 g/L de etanol. El T9 obtuvo 80 g/L, una reducción del 53% de sus Azúcares fermentables y una producción de 45,90 g/L de etanol.

Estos valores se asemejan a los obtenidos en la investigación de (Utrilla, Cuervo, & Morales, 2001), quien realizó una fermentación a temperaturas similares de 28 -32°C

y determinó que a las 8 horas después de iniciar el proceso hubo una reducción del 66,70%, 38,50% y 50,00% en sus azúcares fermentables, ya que implementó variaciones de levadura utilizada (mayor cantidad en relación a la aplicada en presente trabajo) siendo esta variable el factor de determinación de velocidad de la reacción. Así también en el estudio realizado por (Delgado, Soler, & Peña Angel, 2018) a las 34,5 horas de reacción aplicando una temperatura de 32 °C, la concentración máxima de etanol fue de 22,06 g/L, valores semejantes al T9, ya que a las 36 horas de fermentación obtuvo una concentración de 25,50 g/L.

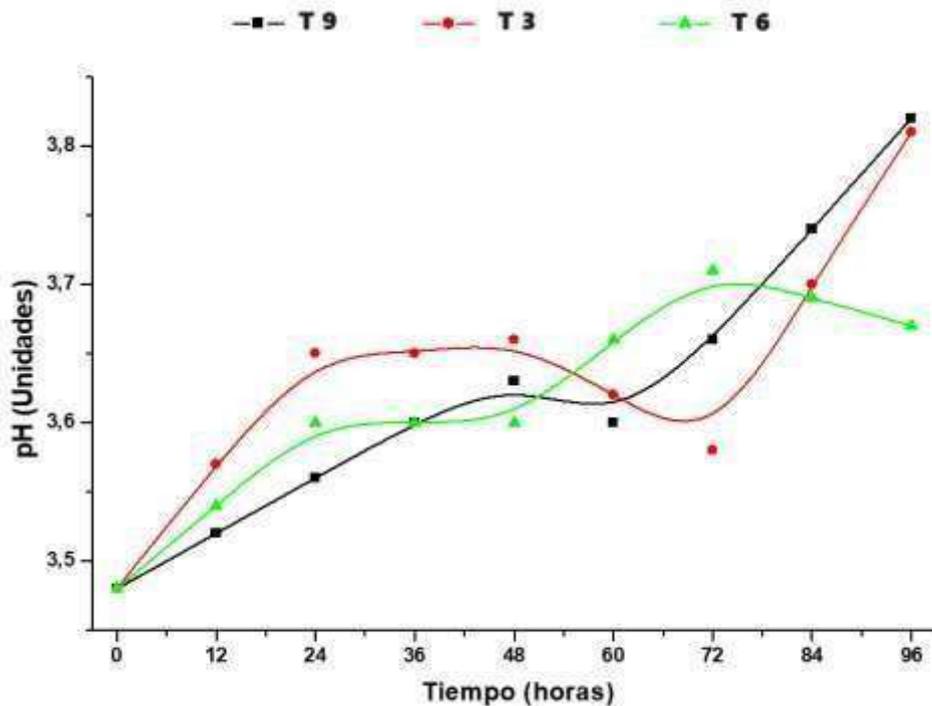


(●) Tratamiento 3: *Saccharomyces Cerevisiae* comercial marca "Instaferm®"; (▲) Tratamiento 6: *Saccharomyces Cerevisiae* modificada Fermivin® 7013; (■) Tratamiento 9: Sin adición de levadura

Gráfico 6. Comparación de los azúcares fermentables y etanol durante la fermentación a temperatura de 30 °C.

Fuente: (Luna & Cobos, 2024).

En el gráfico 7. Se evidencia que el pH en los 3 tratamientos, a partir de las 12 horas del proceso, tuvieron un incremento: el T3 registró un pH final de 3,82; El T6 un pH de 3,81 y el T9 obtuvo 3,67. Datos similares se alcanzó en la investigación de (Utrilla et al., 2001), obteniendo valor de 3.6 ± 0.4 a una fermentación de 28 -32°C.

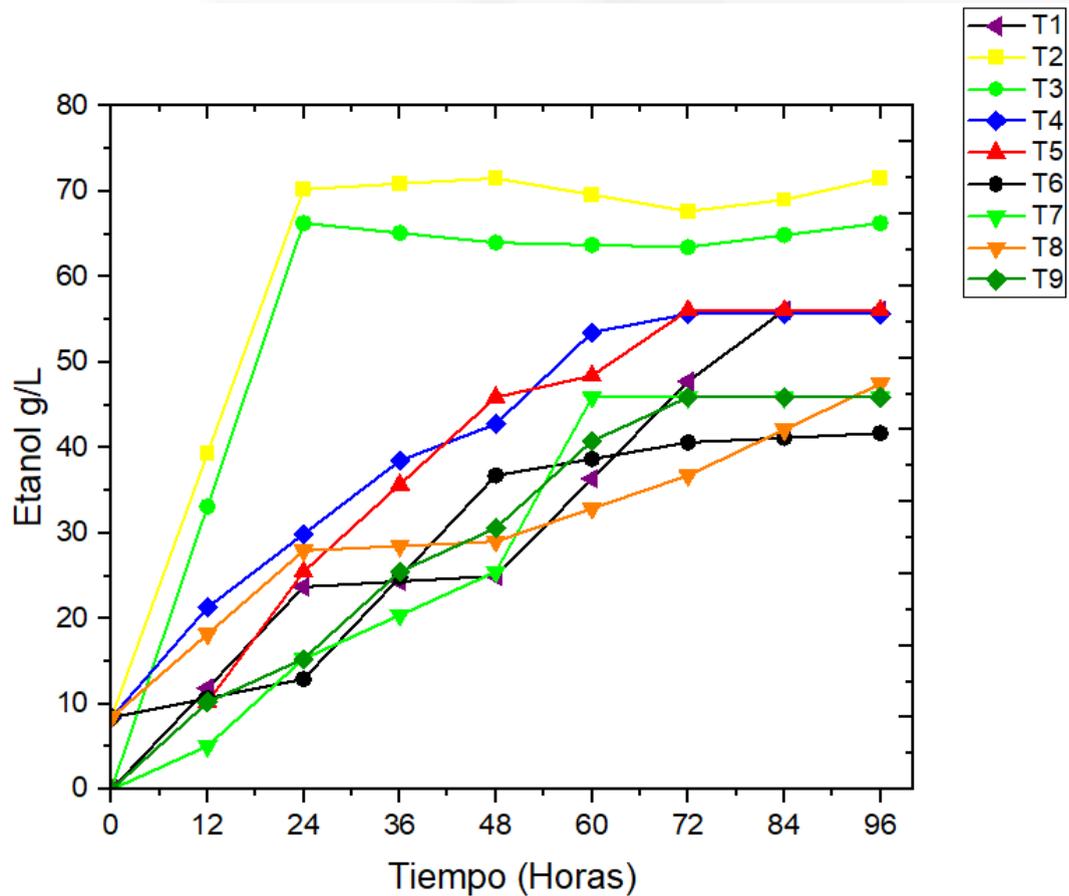


(●) Tratamiento 3: *Saccharomyces Cerevisiae* comercial marca "Instaferm®"; (▲) Tratamiento 6: *Saccharomyces Cerevisiae* modificada Fermivin® 7013; (■) Tratamiento 9: Sin adición de levadura

Gráfico 7. Comparación del pH durante la fermentación a temperatura de 30°C
Fuente: (Luna&Cobos, 2024).

En el Grafico 8. se puede observar que el contenido de etanol de todos los tratamientos desde el inicio de la fermentación fue incrementando al trascurrir las horas de dicho proceso, sin embargo, se visualiza un aumento acelerado a las 12 horas el T2 obtuvo una concentración de 36,72 g/L y el T3 una concentración de 33,15 g/L; mientras que en los demás tratamientos sus valores fueron inferiores a estos.

A las 96 horas del proceso de fermentación se evidencia que el T1 obtuvo una concentración de etanol de 56,10 g/L, el T2 obtuvo 71,91 g/L, el T3: 66,30 g/L, el T4: 56,10 g/L, el T5: 56,10 g/L, el T6: 39,53 g/L, el T7: 45,90 g/L, el T8: 46,41 g/L y el T9: 45,90 g/L. Por lo que indica que el tratamiento que obtuvo mayor producción de concentración de Etanol es el T2 obteniendo 71,91 g/L de etanol.



(◄) Tratamiento 1: *Saccharomyces Cerevisiae* comercial marca "Instaferm® a temp. 15°C; (■) Tratamiento 2. *Saccharomyces Cerevisiae* comercial marca "Instaferm® a temp. 25°C; (●) Tratamiento 3: *Saccharomyces Cerevisiae* comercial marca "Instaferm®" a temp. 30°C; (◆) Tratamiento 4: *Saccharomyces Cerevisiae* modificada Fermivin® 7013 a temp. 15°C; (▲) Tratamiento 5: *Saccharomyces Cerevisiae* modificada Fermivin® 7013 a temp. 25°C; (●) Tratamiento 6: *Saccharomyces Cerevisiae* modificada Fermivin® 7013 a temp. 30°C; (▼) Tratamiento 7: Sin adición de levadura a temp. 15°C (▼) Tratamiento 8: Sin adición de levadura a temp. 25°C; (◆) Tratamiento 9: Sin adición de levadura a temp. 30°C.

Gráfico 8. Comparación de tratamientos en la Producción de Etanol durante la fermentación.

Fuente:(Luna&Cobos, 2024).

CAPÍTULO V: CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1 CONCLUSIONES

Mediante análisis físico químico se logró determinar que el mucílago de cacao es un sustrato idóneo para la producción de etanol por su composición química y su alto contenido en azúcares.

La levadura con mayor eficiencia para la producción de etanol fue la *Saccharomyces Cerevisiae* Comercial marca Instaferm® al obtener mayor concentración de etanol (71,91 g/L) en un menor tiempo ya que a las 12 horas de fermentación obtuvo un 36,72 g/L de etanol.

Se determinó que la producción de etanol es directamente proporcional a la cantidad de azúcares fermentables del mucilago de cacao, ya que al transcurrir el proceso de fermentación se evidenció una disminución de la concentración de los azúcares fermentables y un incremento en la producción de etanol. Además, la temperatura idónea para este proceso es de 25°C.

5.2 RECOMENDACIONES

En futuras investigaciones se deberá de analizar más parámetros en cuanto a la caracterización del mucilago de cacao, utilizando mayor variedad de equipos y metodologías; además se deberá de incrementar el tiempo de control del proceso de fermentación alcohólica.

Se debe de evaluar la eficiencia para la producción de etanol a partir del mucilago de cacao utilizando otros tipos de levaduras modificadas genéticamente, ya que actualmente en el mercado hay una gran variedad de ellas, de esta manera poder establecer comparaciones.

Además, se debería de ampliar el rango de control a temperaturas mayores durante la fermentación alcohólica.

BIBLIOGRAFÍA

1. Alava, W. (2020). *CARACTERIZACIÓN FÍSICA – QUÍMICA DEL MUCÍLAGO DE CACAO (THEOBROMA CACAO L.) CON ÉNFASIS EN LOS AZÚCARES QUE LO COMPONEN.*
2. Alcívar, K., Quezada, J., Barrezueta, S., Garzón, V., & Carvaja, H. (2019). Análisis económico de la exportación del cacao en el Ecuador durante el periodo 2014 – 2019.
3. Anvoh, K. Y., Zoro Bi, A., & Gnakri, D. (2009). Production and characterization of juice from Mucilage of cocoa beans and its Transformation into Marmalade.
4. Arteaga Yadira Estrella. (2013). ESTUDIO DEL DESPERDICIO DEL MUCILAGO DE CACAO EN EL CANTÓN NARANJAL (PROVINCIA DEL GUAYAS) MUCILAGO WASTE RESEARCH IN EL NARANJAL CITY (GUAYAS PROVINCE). Retrieved from <http://www.anecacao.com/index.php/es/asistencia-tecnica/articulos-tecnicos.html>
5. Avecillas, J. (2023). *Aprovechamiento del mucílago de Theobroma cacao var. CCN51 y nacional en la elaboración de una bebida alcohólica utilizando dos tipos de levaduras y nutrientes.*
6. Bajaña, Y. (2014). *TIEMPOS Y TEMPERATURAS DE PASTEURIZACION EN LA CONSERVACION DEL JUGO DE CAÑA DE AZUCAR (Saccharum officinarum). SANTO DOMINGO DE LOS TSACHILAS.*
7. Bello, D., Carrera, E., & Díaz, Y. (2006). Determinación de azúcares reductores totales en jugos mezclados de caña de azúcar utilizando el método del ácido 3,5 dinitrosalicílico. La Habana. Retrieved from <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=223120664006>
8. Burini, J. A., Eizaguirre, J. I., Loviso, C., & Libkind, D. (2021). Non-conventional yeasts as tools for innovation and differentiation in brewing. *Revista Argentina de Microbiología*, 53(4), 359–377. doi:10.1016/j.ram.2021.01.003
9. Cardenas, Y. (2017). *RENDIMIENTO DE ALCOHOL DEL MUCILAGO DE CACAO (Theobroma cacao L.) DE LOS CLONES CCN-51 E IMC-67 CON EL USO DE LEVADURA COMERCIAL (Saccharomyces cerevisiae Meyen ex E.C Hansen).*
10. Carvajal, V. (2022). *Caracterización Fisicoquímica del Mucilago del Cacao.*
11. Castro, Y. (2023). *Extracción y procesamiento del mucilago de cacao (Theobroma cacao L.), y su uso en el campo agrícola.*
12. Cornejo, O. (2022). *EVALUACIÓN DEL USO DE MUCILAGO DE CACAO (Theobroma Cacao) COMO SUSTRATO PARA LA PRODUCCIÓN DE POLIHIDROXIALCANOATOS (PHAs).*
13. Delgado, J., Soler, J., & Peña Angel. (2018). Optimización de la producción de bioetanol en procesos fermentativos del mucílago de Cacao CCN – 51 en un biorreactor tipo batch. *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers*, 6, 210–216. doi:10.1016/j.jtice.2016.06.023
14. Dostert, N., Roque, J., Cano, A., La Torre, M. I., & Weigend, M. (2011). *Factsheet: Datos botánicos de cacao.*
15. Espinoza, F., & Mendieta, E. (2018). *EFFECTOS DE LA FERMENTACIÓN LÁCTICA DEL*

LACTOSUERO Y ALCOHÓLICA DEL MUCÍLAGO DE CACAO EN LA CONCENTRACIÓN FINAL DE UNA BEBIDA ALCOHÓLICA.

16. García, W. (2019). *CARACTERIZACIÓN DIFERENCIAL DENDROLÓGICA DEL CACAO CRIOLLO – Theobroma cacao L. DE JAÉN Y SAN IGNACIO – REGIÓN CAJAMARCA*”.
17. Gerard, L. M. (2015). *CARACTERIZACIÓN DE BACTERIAS DEL ÁCIDO ACÉTICO DESTINADAS A LA PRODUCCIÓN DE VINAGRES DE FRUTAS TESIS DOCTORAL*.
18. Goya, M. (2013). “*Obtención de una bebida alcohólica a partir de mucílago de cacao, mediante fermentación anaerobia en diferentes tiempos de inoculación*”.
19. Guerra, K. (2019a). *EVALUACIÓN DE LEVADURAS A PARTIR DE DOS VARIEDADES DE MUCÍLAGO DE CACAO (Theobroma cacao) PARA SU USO EN PROCESOS FERMENTATIVOS*.
20. Guerra, K. (2019b). *EVALUACIÓN DE LEVADURAS A PARTIR DE DOS VARIEDADES DE MUCÍLAGO DE CACAO (Theobroma cacao) PARA SU USO EN PROCESOS FERMENTATIVOS*.
21. Hernández A, R. M., & Rojas O, P. K. (2011). *ESTUDIO DEL MUCÍLAGO DE CACAO (Theobroma cacao L.) CON FINES DE APROVECHAMIENTO INDUSTRIAL Y ARTESANAL, EN BARLOVENTO, ESTADO MIRANDA*.
22. Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura (IICA). (1982). *EL CACAO*.
23. La Asociación Nacional de Exportadores e Industriales de Cacao del Ecuador ANECACAO. (2023). *Tipos de Cacao*.
24. Macias, A. M., Pérez, J. C., & Torres, J. C. (2022). Pasado, presente y perspectiva del bioetanol en Ecuador. *CIENCIA UNEMI*, 15(40), 38–51. doi:10.29076/issn.2528-7737vol15iss40.2022pp38-51p
25. Mejia, L., & Aguello, O. (2000). *Tecnología para el Mejoramiento del Sistema de Producción de Cacao*.
26. Mendoza, M. (2005). Importancia de la identificación de levaduras.
27. Miguel Estrada, W., Romero, X., & Moreno, J. A. (2011). *Guía técnica del cultivo de cacao manejado con técnicas agroecológicas*.
28. Moreira, T. (2019). *CARACTERIZACIÓN DEL MUCÍLAGO DE CACAO (Theobroma cacao L.) NACIONAL Y TRINITARIO EN EL CANTÓN QUEVEDO*”.
29. Moya, N., & Gómez, S. (2020). *Análisis comparativo de la diversidad microbiana y la producción de compuestos Bioquímicos de cacao (Theobroma cacao) variedades nacional y trinitario CCN-51 durante la fermentación*.
30. Nielsen, D. S., Jakobsen, M., & Jespersen, L. (2010). *Candida halmiae sp. nov., Geotrichum ghanense sp. nov. and Candida awuuii sp. nov., isolated from Ghanaian cocoa fermentations. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 60(6), 1460–1465. doi:10.1099/ijs.0.016006-0
31. OENOBANDS SAS. (2017). (Fermivin) *Saccharomyces cerevisiae var. cerevisiae # 7013*.

32. Pacheco, D. (2020). *OBTENCIÓN DE UNA BEBIDA ALCOHOLICA A PARTIR DEL MUCILAGO DE CACAO EN FINCA DEL URABÁ.*
33. Pascual, M. del R. (2005). *ENFERMEDADES DE ORIGEN ALIMENTARIO: SU PREVENCIÓN.*
34. Pascual, R. A., & Calderón, V. (2005). *MICROBIOLOGÍA ALIMENTARIA Metodología analítica para alimentos y bebidas.*
35. Peralta, C., Sauka, D. H., Marozzi, A., Del Valle, E. E., & Palma, L. (2021). Argentinean *Bacillus thuringiensis* strains exhibiting distinct morphology of their parasporal crystals. *Revista Argentina de Microbiología*, 53(4), 378–379. doi:10.1016/j.ram.2020.09.005
36. Prado, F. (2019). *Caracterización agronómica y morfológica de fruto y semilla de cuatro clones promisorios de cacao (Theobroma cacao L.), Kimbiri, Cusco.*
37. Ren Lim, A. C., Fui Chin, B. L., Abbas Jawad, Z., & Ling Hii, K. (2016). Kinetic Analysis of Rice Husk Pyrolysis Using Kissinger-Akahira-Sunose (KAS) Method. *Procedia Engineering*, 148, 1247–1251. doi:10.1016/j.proeng.2016.06.486
38. Utrilla, M., Cuervo, J., & Morales, M. A. (2001). *PRODUCCIÓN DE ETANOL A PARTIR DE JUGO DE MUCÍLAGO DE CACAO (Theobroma cacao) COMO SUBPRODUCTO DE LA FERMENTACIÓN. Ingeniería Química.*
39. Vázquez, H. J., & Dacosta, O. (2007). Fermentación alcohólica: Una opción para la producción de energía renovable a partir de desechos agrícolas Alcoholic fermentation: An option for renewable energy production from agricultural residues, 249–259.
40. Walker, G. M., & Walker, R. S. K. (2018). Enhancing Yeast Alcoholic Fermentations. *Advances in Applied Microbiology*, 105, 87–129. doi:10.1016/bs.aambs.2018.05.003
41. Zambrano, M. (2015). *EVALUACIÓN PRODUCTIVA Y SANITARIA DE SIETE CLONES DE CACAO (Theobroma cacao L.) EN LA HDA RIO LINDO EN LA ZONA DE QUEVEDO.*

ANEXOS



Anexo 1. Esterilización del Mucilago de Cacao



Anexo 2. Preparación de Fermentador



Anexo 3. *Saccharomyces cerevisiae* Comercial marca Instaferm®



Anexo 4. *Saccharomyces cerevisiae* Fermivin® 7013



Anexo 5. Pesaje de Levaduras



Anexo 7. Rotulación de Muestras



Anexo 6. Equipo de Refrigeración para fermentación A 15°C



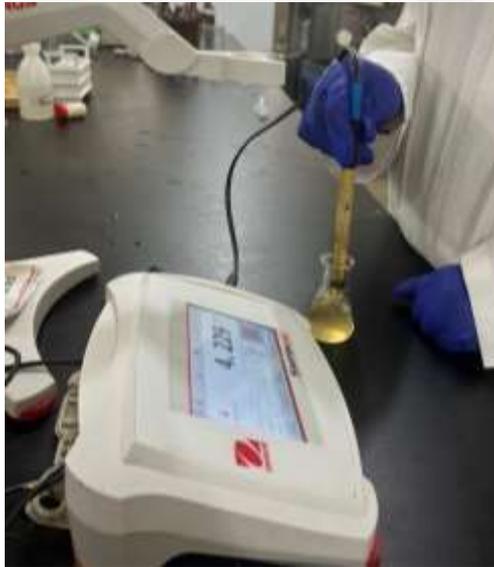
Anexo 8. Estufa para fermentación a 30°C



Anexo 10. Extracción de Muestra



Anexo 9. Medición de °Brix



Anexo 11. Medición de pH



Anexo 12. Cromatógrafo de gases modelo Agilent 7820A.

UNEMI

UNIVERSIDAD ESTATAL DE MILAGRO

¡Evolución académica!

@UNEMIEcuador

