UTMACH

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y DE LA SALUD

CARRERA DE INGENIERÍA EN ALIMENTOS

EVALUACIÓN DEL MUCÍLAGO DE CACAO (THEOBROMA CACAO L) PARA LA OBTENCIÓN DE ETANOL DE SEGUNDA GENERACIÓN

JORDAN COBOS KAREN PAMELA
INGENIERA EN ALIMENTOS

PARRA FLORES MARIA DEL CISNE
INGENIERA EN ALIMENTOS

MACHALA
2020

UTMACH

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y DE LA SALUD

CARRERA DE INGENIERÍA EN ALIMENTOS

EVALUACIÓN DEL MUCÍLAGO DE CACAO (THEOBROMA CACAO L) PARA LA OBTENCIÓN DE ETANOL DE SEGUNDA GENERACIÓN

JORDAN COBOS KAREN PAMELA
INGENIERA EN ALIMENTOS

PARRA FLORES MARIA DEL CISNE
INGENIERA EN ALIMENTOS

MACHALA
2020

UTMACH

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y DE LA SALUD

CARRERA DE INGENIERÍA EN ALIMENTOS

TRABAJO TITULACIÓN
TRABAJO EXPERIMENTAL

EVALUACIÓN DEL MUCÍLAGO DE CACAO (THEOBROMA CACAO L) PARA LA OBTENCIÓN DE ETANOL DE SEGUNDA GENERACIÓN

JORDAN COBOS KAREN PAMELA
INGENIERA EN ALIMENTOS

PARRA FLORES MARIA DEL CISNE
INGENIERA EN ALIMENTOS

AYALA ARMIJOS JOSE HUMBERTO

MACHALA, 06 DE MAYO DE 2020

MACHALA
2020

Nota de aceptación:

Quienes suscriben, en nuestra condición de evaluadores del trabajo de titulación denominado EVALUACIÓN DEL MUCÍLAGO DE CACAO (THEOBROMA CACAO L) PARA LA OBTENCIÓN DE ETANOL DE SEGUNDA GENERACIÓN, hacemos constar que luego de haber revisado el manuscrito del precitado trabajo, consideramos que reúne las condiciones académicas para continuar con la fase de evaluación correspondiente.

AYALA ARMIJOS JOSE HUMBERTO
0704018803
TUTOR - ESPECIALISTA 1

GUANOQUIZA RIVERA MANUEL ISRAEL
0502966377
ESPECIALISTA 2

CARRION ESPINOSA WILSON EMMANUEL
0704725688
ESPECIALISTA 3

Machala, 06 de mayo de 2020

cacao

INFORME DE ORIGINALIDAD

1%	0%	0%	0%
INDICE DE SIMILITUD	FUENTES DE INTERNET	PUBLICACIONES	TRABAJOS DEL ESTUDIANTE

FUENTES PRIMARIAS

1	repositorio.utn.edu.ec Fuente de Internet	<1%
2	repositorio.unan.edu.ni Fuente de Internet	<1%
3	biblio.ugent.be Fuente de Internet	<1%
4	Submitted to Bachillerato Alexander Bain, S.C Trabajo del estudiante	<1%
5	Submitted to Universidad San Ignacio de Loyola Trabajo del estudiante	<1%

Excluir citas	Activo	Excluir coincidencias	< 10 words
Excluir bibliografía	Apagado		

CLÁUSULA DE CESIÓN DE DERECHO DE PUBLICACIÓN EN EL REPOSITORIO DIGITAL INSTITUCIONAL

Las que suscriben, JORDAN COBOS KAREN PAMELA y PARRA FLORES MARIA DEL CISNE, en calidad de autoras del siguiente trabajo escrito titulado EVALUACIÓN DEL MUCÍLAGO DE CACAO (THEOBROMA CACAO L) PARA LA OBTENCIÓN DE ETANOL DE SEGUNDA GENERACIÓN, otorgan a la Universidad Técnica de Machala, de forma gratuita y no exclusiva, los derechos de reproducción, distribución y comunicación pública de la obra, que constituye un trabajo de autoría propia, sobre la cual tienen potestad para otorgar los derechos contenidos en esta licencia.

Las autoras declaran que el contenido que se publicará es de carácter académico y se enmarca en las dispociones definidas por la Universidad Técnica de Machala.

Se autoriza a transformar la obra, únicamente cuando sea necesario, y a realizar las adaptaciones pertinentes para permitir su preservación, distribución y publicación en el Repositorio Digital Institucional de la Universidad Técnica de Machala.

Las autoras como garantes de la autoría de la obra y en relación a la misma, declaran que la universidad se encuentra libre de todo tipo de responsabilidad sobre el contenido de la obra y que asumen la responsabilidad frente a cualquier reclamo o demanda por parte de terceros de manera exclusiva.

Aceptando esta licencia, se cede a la Universidad Técnica de Machala el derecho exclusivo de archivar, reproducir, convertir, comunicar y/o distribuir la obra mundialmente en formato electrónico y digital a través de su Repositorio Digital Institucional, siempre y cuando no se lo haga para obtener beneficio económico.

Machala, 06 de mayo de 2020

JORDAN COBOS KAREN PAMELA
0750452336

PARRA FLORES MARIA DEL CISNE
0705376978

DEDICATORIA

Este trabajo se lo dedico a Dios por darme fuerzas y guiarme en esta etapa universitaria, a mis padres quienes han sido las personas que con mucho esfuerzo y amor han permito que puedan culminar mis estudios universitarios, lo cual se les retribuirá siendo una excelente profesional.

AGRADECIMIENTO

Agradezco a Dios por darme la oportunidad de poder culminar mis estudios universitarios, a mis padres por todo su apoyo incondicional que siempre me brindaron en cada momento, a mi familia por sus consejos que de una u otra manera me han servido de mucho a lo largo de todo este tiempo.

A mis tutores y docentes, por sus recomendaciones ya que han sido una parte fundamental para el desarrollo del proyecto de titulación.

RESUMEN

Esta investigación se realizó con la finalidad de evaluar el mucílago de cacao (***Theobroma Cacao L)*** para la producción de etanol de segunda generación mediante el proceso de fermentación alcohólica, con la cual se pretende aprovechar este subproducto que se genera en la cosecha de los granos de cacao, ya que este posee propiedades fermentativas. Para iniciar el proceso de fermentación, se llevó a cabo primero la recolección del mucílago de cacao en condiciones asépticas, se determinó las características fisicoquímicas de la muestra mediante los análisis respectivos tales como: pH (potenciometría), °Brix (refractometría), acidez titulable (valoración ácido-base), humedad (termo gravimétrico), cenizas (calcinación) y contenido de azúcares reductores (ácido 3,5-dinitrosalicílico). El proceso fermentativo se inicia cuando los azúcares reductores presentes en el mucílago se transforman en etanol y existe la formación de dióxido de carbono (CO_2), en donde el pH aumentó y la temperatura de fermentación fue constante. En esta investigación se realizó 4 tratamientos, en los cuales se estableció dos tipos de fermentación, espontánea y controlada. Para llevar a cabo la fermentación espontánea, el mucílago de cacao se lo puso en una incubadora con agitación constante a temperatura de 25 °C. En la fermentación controlada primero se esterilizó en autoclave la muestra a temperatura de 121 °C durante 15 minutos, con la finalidad de eliminar microorganismos que puedan afectar el proceso de fermentación. Se dejó enfriar durante una hora hasta llegar a una temperatura de 30 °C, para proceder a realizar la inoculación se utilizó levadura *Saccharomyces cerevisiae* comercial (1 g/L), se procedió a fermentar en las mismas condiciones que el tratamiento de la fermentación espontánea, utilizando una incubadora. Los tratamientos de fermentación controlada realizados fueron; ajuste de pH, adición de nutriente $(NH_4)_2SO_4$ y levadura. El proceso fermentativo fue de 7 días, en los cuales se llevó un control de pH, cantidad de azúcares reductores y concentración de etanol, tomando muestra cada 24 horas.

Se obtuvo como resultados de la caracterización fisicoquímica del mucílago de cacao los siguientes porcentajes: 3,70 de pH, 1,15 acidez, 17,40 de °Brix, 80,48 de humedad, 2,15 de cenizas y 16,99 de azúcares reductores. Durante la fermentación del mucílago de los 4 tratamientos propuestos alcanzaron los siguientes resultados: Tratamiento 1: 3.79 de pH, 76.63 g/L de azúcares reductores, 5.16% de alcohol. Tratamiento 2: 3.85 de pH, 42.43 g/L de azúcares reductores, 7.04 % de alcohol. Tratamiento 3: 4.23 de pH, 22.42 g/L de

azúcares reductores, 8.14 % de alcohol. Tratamiento 4: 3.93 de pH, 35.56 g/L de azúcares reductores, 7.41 % de alcohol. Las concentraciones de etanol presentes en las muestras se determinaron mediante el método de HPLC.

En conclusión el mucílago de cacao es un recurso que posee propiedades idóneas para realizar una fermentación alcohólica. Se determinó que el tratamiento 3 (pH ajustado) es el de mayor eficacia, por lo cual se estableció que el pH de 4 era el óptimo para la fermentación del mucílago, además se produjo un mayor consumo de azúcares reductores en un tiempo menor y las concentraciones de etanol fueron mayores con respecto a los demás tratamientos.

Palabras claves: *Theobroma Cacao L*, mucílago, Saccharomyces *cerevisiae*, Glucólisis fermentación, etanol, azúcares.

ABSTRACT

This research was carried out in order to evaluate the cocoa mucilage (Theobroma Cacao L) for the production of second generation ethanol through the alcoholic fermentation process, with which it is intended to take advantage of this by-product that is generated in the harvest of the beans of cocoa, since it has fermentative properties. To start the fermentation process, the cocoa mucilage was first collected under aseptic conditions, the physicochemical characteristics of the sample were determined by the respective analyzes such as: pH (potentiometry), ° Brix (refractometry), titratable acidity (acid-base titration), humidity (thermo gravimetric), ash (calcination) and reducing sugar content (3,5-dinitrosalicylic acid). The fermentation process begins when the reducing sugars present in the mucilage are transformed into ethanol and there is the formation of carbon dioxide (CO2), where the pH increased and the fermentation temperature was constant. In this investigation, 4 treatments were carried out, in which two types of fermentation, spontaneous and controlled, were established. To carry out spontaneous fermentation, the cocoa mucilage was placed in an incubator with constant stirring at a temperature of 25 ° C. In the controlled fermentation, the sample was autoclaved first at a temperature of 121 ° C for 15 minutes, in order to eliminate microorganisms that could affect the fermentation process. It was allowed to cool for an hour until reaching a temperature of 30 ° C, to proceed with the inoculation, commercial Saccharomyces cerevisiae yeast (1 g / L) was used, it was fermented under the same conditions as the spontaneous fermentation treatment, using an incubator. The controlled fermentation treatments performed were; pH adjustment, nutrient addition (NH4) 2SO4 and yeast. The fermentation process was 7 days, in which a pH control, quantity of reducing sugars and ethanol concentration were carried out, taking sample every 24 hours.

The following percentages were obtained as a result of the physicochemical characterization of cocoa mucilage: 3.70 pH, 1.15 acidity, 17.40 ° Brix, 80.48 humidity, 2.15 ashes and 16.99 of reducing sugars. During the mucilage fermentation the 4 proposed treatments achieved the following results: Treatment 1: 3.79 pH, 76.63 g / L of reducing sugars, 5.16% alcohol. Treatment 2: 3.85 pH, 42.43 g / L of reducing sugars, 7.04% alcohol. Treatment 3: 4.23 pH, 22.42 g / L of reducing sugars, 8.14% alcohol. Treatment 4: 3.93 pH, 35.56 g / L of reducing sugars, 7.41% alcohol. The concentrations of ethanol present in the samples were determined by the HPLC method.

In conclusion, cocoa mucilage is a resource that has ideal properties for alcoholic fermentation. It was determined that treatment 3 (adjusted pH) is the most effective, so it was established that the pH of 4 was the optimum for the fermentation of the mucilage, in addition there was a greater consumption of reducing sugars in a shorter time and the Ethanol concentrations were higher compared to the other treatments.

Keywords: Theobroma Cacao L, mucilage, Saccharomyces cerevisiae, Fermentation glycolysis, ethanol, sugars.

INDICE GENERAL

DEDICATORIA I
AGRADECIMIENTO II
RESUMEN III
ABSTRACT V
INDICE GENERAL VII
INDICE DE TABLAS IX
INDICE DE FIGURAS X
INDICE DE ANEXOS XI
CAPÍTULO I 3
1. INTRODUCCIÓN 3
1.2. Planteamiento del problema 4
1.3. Objetivos 5
1.3.1. Objetivo general 5
1.3.2. Objetivos específicos 5
1.4. Hipótesis 6
1.4.1. Hipótesis alternativa 6
1.4.2. Hipótesis nula 6
CAPITULO II 7
2. MARCO TEÓRICO 7
2.1. Cacao (*Theobroma cacao L.*) 7
2.1.1. Composición 8
2.1.2. Producción 9
2.1.3. Exportación 9
2.1.4. Variedades 10
a) Criollo 10
b) Forasteros Amazónicos 10
c) Trinitarios 10
d) CCN51 (Colección Castro Naranjal 51) 11
e) Nacional.- 12
2.2. Mucílago de Cacao 12
2.2.1. Azúcares presentes en el mucílago de cacao 13
2.3. Fermentación alcohólica 14
2.3.1. Microorganismos que intervienen en la fermentación 14
2.3.1.1. *Saccharomyces cerevisiae* 15
2.3.2. Glucólisis 16

2.4. Etanol 17
CAPÍTULO III 18
3. METODOLOGÍA 18
3.1. Ubicación de la investigación 18
3.2. Preparación de la muestra 18
3.3. Análisis fisicoquímicos para evaluar el mucílago de cacao 18
3.3.1. Determinación de pH 18
3.3.2. Determinación de Acidez 18
3.3.3. Determinación de Humedad 18
3.3.4. Determinación de cenizas 19
3.3.5. Determinación de azúcares reductores 19
3.3. Determinación de etanol 20
3.4. Diagrama de flujo del proceso de fermentación del mucílago de cacao 21
3.4. Materiales, reactivos y equipos 23
3.4.1. Materiales de laboratorio 23
3.4.2. Reactivos 23
3.4.3. Equipos 23
CAPITULO IV 24
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN 24
4.1. Evaluación fisicoquímica del mucílago de cacao 24
4.2. Control de los parámetros de pH y azúcares reductores durante el proceso de fermentación del mucílago de cacao. 25
4.2.1. Consumo de azúcares durante la fermentación alcohólica 25
4.2.2. Evaluación de la influencia del pH en la fermentación 26
4.3. Porcentaje de alcohol 28
CAPÍTULO V 30
CONCLUSIONES 30
BIBLIOGRAFÍA 31
ANEXOS 36

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Composición química del cacao 8
Tabla 2. Composición química del Mucílago 13
Tabla 3. Caracterización fisicoquímica del mucílago de cacao (Theobroma cacao L.). 24

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Cacao criollo 10
Figura 2. Cacao forastero amazónico 10
Figura 3. Cacao Trinitario..... 11
Figura 4. Cacao CCN-51 11
Figura 5. Cacao Nacional 12
Figura 6. Glucólisis..... 16
Figura 7. Curva de calibración..... 20
Figura 8. Proceso de fermentación del mucílago de cacao para obtener etanol de segunda generación. 21
Figura 9. Diseño del fermentador 22
Figura 10. Consumo de azúcares durante la fermentación alcohólica..... 25
Figura 11. Variación de pH en la fermentación alcohólica de los diferentes tratamientos. 27
Figura 12. Porcentaje de alcohol en los diferentes tratamientos de fermentación..... 28

INDICE DE ANEXOS

Anexo 1. Patrones de la curva de calibración. 36
Anexo 2. Determinación de la acidez titulable 36
Anexo 3. Determinación de °Brix. 36
Anexo 4. Acondicionamiento de la materia prima. 36
Anexo 5. Finca de cacao en la Parroquia de Barbones 36
Anexo 6. Recolección del mucílago de cacao. 36
Anexo 7. Determinación de pH. 36
Anexo 8. Determinación de porcentaje de cenizas. 36
Anexo 9. Determinación del porcentaje de humedad. 36
Anexo 10. Esterilización del mucílago. 37
Anexo 11. Reactivo: ácido 3,5-dinitrosalicílico 37
Anexo 12. Fermentadores 37

CAPÍTULO I

1. INTRODUCCIÓN

Ecuador es un país productor y exportador de cacao fino de aroma con reconocimiento a nivel mundial por su calidad y aroma. Las zonas productoras están distribuidas en las provincias de Guayas, Los Ríos, Manabí, Esmeraldas, Sierra Central, parte de la Amazonia, Zamora Chinchipe, Orellana, Napo y Sucumbíos. Se produce cacao criollo y CCNN-51 (ANECACAO, 2019).

La agroindustria conjuntamente con la globalización ha ido creciendo y aportando con nuevos productos elaborados y semielaborados a base de diferentes frutas, verduras, entre otros alimentos (Martínez & García, 2017). En este caso de estudio se pretende aprovechar el Mucílago de cacao mediante la fermentación alcohólica para obtener etanol

La fermentación alcohólica presenta reacciones bioquímicas, en el cual la levadura *Saccharomyces cerevisiae* metabolizar azúcares y otros sustancias nutritivas para su crecimiento y conversión de los azúcares en etanol. También se puede hacer uso de otros sustratos ricos en azúcares tales como la uva, manzana y algunos jugos como la caña de azúcar para producir etanol (Anvoh, Guéhi, Beugré, Kinimo, & Gnakri, 2010).

Uno de los factores preliminares que se debe de considerar antes del proceso de fermentación alcohólica son las condiciones sanitarias de este subproducto, porque al encontrarse contaminado con bacterias acéticas, el alcohol formado rápidamente comienza a oxidarse y a convertirse en ácido acético.

Los microorganismos que se encuentran presente en la fermentación del mucílago de cacao contiene cepas no controladas como levaduras, mohos y bacterias, además estos ayudan a la fermentación, además azúcares que se transforman en alcohol y otros productos secundarios como los ácidos orgánicos (Anvoh et al., 2010).

Considerando lo antes mencionado, el estudio sostiene como objetivo evaluar el mucílago de cacao *(Theobroma cacao*) para la producción de etanol de segunda generación mediante fermentación alcohólica. Se realizaron diferentes experimentos en los cuales se modificaron algunas variables del proceso tales como pH, acidez, concentración de nutrientes e inóculo y tomando como control la fermentación espontánea.

1.2. Planteamiento del problema

El Ecuador se posiciona como el principal exportador de cacao nacional fino de aroma manteniéndose con el 75% de exportaciones de este producto a escala mundial, mientras que el restante 25% pertenece a otras variedades como el CCN51 (ANECACAO, 2015).

El cacao es el producto de exportación tradicional con mayor historia en la economía del país, durante los últimos 17 años, la producción de cacao ecuatoriano se ha triplicado. En el 2003 el volumen de producción fue de 96.481 TM frente a las cerca de 310.000 TM producidas en 2016 (MAG, 2019).

Dentro del proceso de obtención del grano de cacao se generan residuos como las cáscaras, placenta y mucílago. El mucílago representa alrededor del 40% del peso de las almendras frescas, del cual el 5 al 7% del mucílago se libera libremente y el restante se queda siendo parte de la protección natural de las semillas de cacao, el mismo que sirve de sustrato para los microorganismos que intervienen en el proceso de fermentación de las semillas.

Este exudado o mucílago de cacao liberado es rico en azúcares fermentables en aproximadamente un 19% de azúcares, 0.09% de proteína, 0.9% de pectina, 0.4% de sales minerales, 0.77% de ácido cítrico y 0.47 de fibra cruda, del cual no es aprovechado en su totalidad en la generación de otros productos debido al desconocimiento de su aporte nutricional y el desinterés en la innovación agrícola por parte de los productores cacaoteros, siendo este una fuente rica de azúcares para obtención de etanol (Romero, Cuervo, Robles, Rangel, & López, 2018). El manejo inadecuado de la eliminación de este llega a contaminar el suelo, lo cual esto llega a convertirse en un problema ambiental ya que puede llegar a infestar a los cultivos de cacao (Vásquez *et al*., 2019). Por lo general se desperdicia más de 70 litros por toneladas de este mucílago (Sanchez, Castro, Rodriguez, & Trujillo, 2019).

Mediante la fermentación alcohólica se pretende obtener etanol, ya que esta se obtiene a partir de la conversión de los azúcares presentes en el mucílago, y además se produce CO_2, así para llegar a minimizar el impacto ambiental y de así aprovechar este subproducto de la agroindustria cacaotera, con la finalidad de aumentar los beneficios económicos del productor ya que mediante la aplicación de nuevas tecnologías.

1.3. Objetivos

1.3.1. Objetivo general

Evaluar el potencial del mucílago de cacao *(Theobroma Cacao L*) para la producción de etanol de segunda generación (2G) mediante fermentación alcohólica.

1.3.2. Objetivos específicos

- Determinar las características fisicoquímicas del mucílago de cacao (*Theobroma Cacao* L).
- Cuantificar azúcares reductores existentes en el mucílago de cacao (*Theobroma Cacao* L).
- Evaluar la influencia del pH en la fermentación alcohólica del mucílago de cacao.
- Determinar la cantidad de etanol producida en el proceso de fermentación alcohólica.

1.4.Hipótesis

1.4.1. Hipótesis alternativa

Es posible obtener etanol a partir de la fermentación alcohólica del mucílago de cacao (*Theobroma Cacao* L).

1.4.2. Hipótesis nula

No es posible obtener etanol a partir de la fermentación alcohólica del mucílago de cacao (*Theobroma Cacao* L).

CAPITULO II

2. MARCO TEÓRICO

2.1. Cacao (*Theobroma cacao L.*)

A nivel mundial se conoce al cacao por ser materia prima principal para la elaboración de chocolates, esta especie pertenece al grupo de los *Theobroma*, La finalidad del cultivo de la mazorca de cacao es la obtención de las semillas que se encuentran en su interior, y estas al ser tratadas correctamente poseen un alto valor comercial y nutricional (Campos, Nieto, & Oomah, 2018).

El árbol de cacao tiene su origen en los territorios amazónicos de Ecuador, Perú y Colombia, también se conoce que es originario de en algunas partes de las Guyana. Con el pasar del tiempo se extendió su cultivo por Centroamérica, África, Asia en donde es cultivado en las zonas Subtropicales y tropicales de cada una de las regiones antes mencionadas, teniendo óptimos resultados de producción por el clima apropiado, casi igual al de su origen (Osorio, Leiva, & Ramírez, 2017). Dentro de las características generales esta la altura del árbol la cual es de 8 m de altura aproximadamente, su crecimiento se realiza ambientes cálidos y húmedos, en tierras fértiles y drenadas (Kongor et al., 2016). Además posee flores de tonalidad blancas, las cuales se encuentran sobre el tallo, el tamaño de sus frutos es de aproximadamente 15 a 20 cm de longitud, con un espesor de 7 a 10 cm y el peso esta alrededor de 500 g (Siedentopp, 2009). Dependiendo de la variedad de la fruta existen variaciones en su apariencia, así como también en su peso y dimensiones (Kongor et al., 2016).

El tiempo de cosecha se realiza a partir de 2 a 3 años de la siembra, ya que la reproducción del cultivo se da de manera rápida (De La Cruz, Vargas, & Del Angel, 2009). Pero para que la producción sea de calidad sus granos son seleccionados con anticipación a la siembra del nuevo árbol de cacao. Con el pasar de los años se han realizado variaciones en el cacao creando nuevas especies clonadas o por medio de injertos, o a su vez una reproducción asexual asistida (Peña, Azpeitia, Mirafuentes, Ruíz, & Sáenz, 2016).

Según (Sánchez et al., 2015), quienes mencionan que en Latinoamérica se produce el 15% de toda la producción mundial de cacao (*Theobroma Cacao L*), siendo Ecuador y Brasil los dos países sudamericanos que tienen la mayor producción de cacao en América. En

los países de Ecuador y Perú fermentan el cacao utilizando variedad de materiales para obtener chocolates de calidad (Andrade, Rivera, Chire, & Ureña, 2019).

Las zonas de producción se concentran en las provincias de Esmeraldas, El Oro, Guayas, Manabí y Santo Domingo de los Tsáchilas, en el extranjero es apetecido este fruto tiene una concentración de grasas vegetal de un 34%, lo cual es son utilizadas para la elaboración de derivados como licor, manteca de cacao y polvo de cacao. Estos derivados son utilizados en las diferentes industrias de tipo, cosmético y alimenticio entre otras más (Anzules, Borjas, Castro, & Julca, 2018).

2.1.1. Composición

El cacao es un fruto que tiene diferentes formas, tamaño y colores, una de las características es su corteza gruesa, en su interior se encuentran las semillas o pepas cacao, las cuales están recubiertas por su pulpa conocida como mucílago el cual tiene un aroma particular muy agradable, que comprende el 40% del peso de este (K. Ortiz & Álvarez, 2015).

Se estima que cada vaina de cacao se encuentran alrededor de 30 hasta 40 semillas, una de las particularidades para reconocer que está lista para la cosecha es la tonalidad amarilla que toma la corteza del fruto, otro aspecto es la consistencia blanda de su cáscara y se torna suave de cortar (Kongor et al., 2016).

(K. Ortiz & Álvarez, 2015), describen la composición del grano de cacao de la siguiente manera:

Tabla 1. Composición química del cacao

Componente	% p/p
Grasa	54
Proteína	11,5
Ácidos orgánicos y aromas	9,5
Celulosa	9
Ácidos tánicos y color	6
Agua	5
Sales minerales	2,6
Teobromina	1,2
Azúcares	1
Cafeína	0,2

Fuente: (K. Ortiz & Álvarez, 2015)

2.1.2. Producción

En el año 2018, Ecuador superó su producción de cacao con alrededor de 315,571 toneladas métricas de cacao, y se espera que para el año 2020 la producción aumente en un 10% debido a las condiciones climáticas que vienen variando en la última temporada afectando de manera positiva los cultivos (ANECACAO, 2019). Para el año 2019 llegó a ser el mayor productor de cacao fino de aroma a nivel mundial teniendo el 60% de producción, de procedencia amazónica (Ordoñez, Vera, & Tigselema, 2019).

El Ecuador representa un 12% de la superficie cultivada, convirtiéndose en un recurso que aporta a la economía y genera fuentes de trabajo. Esta semilla es exportada en tres diferentes formas ya sea a granel, productos semielaborados y productos terminados tales como el chocolate (Perez, 2016). En la actualidad la exportación del cacao supera las 315000 toneladas, lo que conlleva a incrementar el precio del quintal de cacao, dentro de las variedades más cultivadas por los productores cacaoteros se encuentra la variedad Nacional (ANECACAO, 2019). Ecuador genera ventaja competitiva con su producto de excelente calidad, en cuanto sabor, aroma, lo cual permite tener una buena cotización y aceptación en los diferentes mercado extranjero (Teneda, Guamán, & Oyaque, 2019).

Las personas más beneficiadas con las grandes producciones de cacao son los campesinos de las provincias de Los Ríos, Manabí, Guayas y El Oro, en cuanto a la generación de empleos (Figueira & Alemanno, 2009). El cacao ecuatoriano al ser el 90% de su comercialización exportado, convierte al Ecuador como el octavo país exportador más importante del mundo (Perez, 2016).

2.1.3. Exportación

La exportación de cacao (*Theobroma Cacao L*) ha hecho que la agroindustria ecuatoriana se dinamice de manera positiva desde hace varias décadas atrás. Esto ha permitido que Ecuador se posiciona entre los mejores 17 países exportadores de cacao. Por su excelente calidad de producto que es utilizado como materia prima para elaborar derivados de cacao y en especial chocolates. Cabe recalcar que Ecuador cubre el 75% es la demanda mundial (Leon, Calderon, & Mayorga, 2016).

En la actualidad Ecuador refleja un 75% de exportación de cacao fino de aroma. De este total un 95% es de la variedad CCN-51, con esta nueva variedad se revolucionó lo mercados extranjero, cabe mencionar que Ecuador ha firmado nuevos tratados con mercados Europeos y Norteamericanos por un aproximado de 5.100 millones de dólares

para ser ellos los compradores del cacao Ecuatoriano (Chávez, Carbo, García, & Cobos, 2019).

2.1.4. Variedades

Existen tres variedades de cacao los cuales son:

a) **Criollo**.- de esta variedad de cacao se obtiene la mejor calidad. Es producido en Centroamérica, al noroeste de Sudamérica y en África. Y representa el 10% de la producción mundial.

Figura 1. Cacao criollo

Fuente: PROECUADOR 2019

b) **Forasteros Amazónicos**.- esta variedad es la de mayor producción, cubre el 70% de la producción mundial, está se concentra en África, Centroamérica, Ecuador y Colombia.

Figura 2. *Cacao forastero amazónico*

Fuente: PROECUADOR 2019

c) **Trinitarios.-** esta variedad de cacao se creó con la mezcla de Criollo y Forasteros llamados híbridos, los cuales tiene un mejor rendimiento en cuanto a producción, tiene una capacidad superior de enfrentar plagas y enfermedades en comparación

de los criollos y forasteros, su aroma y sabor también es de mejor calidad, y su producción es del 20% restante de la producción mundial.

Figura 3. Cacao Trinitario

Fuente: PROECUADOR 2019

Ecuador existen dos variedades de cacao que se cultivan a grandes escalas, estos son; el cacao Nacional y el cacao CCN-51. Las características de ambos son diferentes desde su tonalidad hasta su aroma, lo cual determina su genética de cada variedad (Navia & Pazmiño, 2012). Cada variedad tiene su característica que lo distingue de la otra, en cuanto a las dimensión color, y hasta el mismo aromas es diferente en cada de ellas (Zingiber, 1995).

d) **CCN51 (Colección Castro Naranjal 51).-** Esta variedad es un clon creado en 1965, su nombre significa (Colección Castro Naranjal), una de su características es su tonalidad rojizo en la mazorca desde aparición hasta la etapa de maduración, además de su alto contenido en grasas. Su producción es más óptima, produce cuatro veces más que el tradicional, representa el 78% de volumen de exportación de cacao en el Ecuador, mientras el nacional el 28% del volumen de exportación (ANECACAO, 2015).

Figura 4. Cacao CCN-51

Fuente: (ANECACAO, 2015)

e) **Nacional.-** Esta variedad es de fino aroma, su aroma es particular. Es el cacao más apetecido en la industria chocolatera a nivel mundial, la producción en Ecuador cubre el 5% de oferta en los mercados internacionales. El cacao nacional de Ecuador tiene un posicionamiento en el mercado desde hace varias décadas atrás, de hecho es promovido por ANECACAO en ferias internacionales de negocios, destacando sus características y beneficios al procesarlo y realizar nuevos productos. Este cacao es exportado como materia prima, semielaborado y productos terminados. Esto ha hecho que la industria ecuatoriana genere beneficio a la matriz productiva (ANECACAO, 2015).

Figura 5. Cacao Nacional

Fuente: (ANECACAO, 2015)

Esta variedad conocida también como "Fino de Aroma" o "Arriba" es la más comercializada a nivel nacional y la más reconocida a nivel mundial por ser la materia prima utilizada para la elaboración de chocolates finos de aroma, ya que CCN-51 es utilizado más para la elaboración de otros productos de confitería, además del chocolate (Vargas et al., 2016).

2.2. Mucílago de Cacao

Es el recubriendo que tiene la semilla del cacao con una consistencia viscosa también conocida como (baba), este recubrimiento impide el paso del aire hasta la almendra (Salous, 2019). En la actualidad a los subproductos como la vaina de cacao y al mucílago se les está proporcionando un valor agregado, aplicando nuevas metodologías. Durante la cosecha de los granos del cacao, estos son apilados en tanques de fermentación para así obtener un jugo viscoso proveniente del recubrimiento de la semilla, una de sus características es su sabor dulce (Anvoh, Zoro Bi, & Gnakri, 2009). En el proceso de fermentación se obtiene alrededor de 100 a 150 L de mucílago por toneladas de granos

de cacao (Vásquez et al., 2019). Se estima que aproximadamente de 100 kilogramos de cacao se obtiene de 4 y hasta 7 litros de mucílago en las primeras horas de la fermentación (Santana, Vera, Vallejo, & Alvarez, 2018).

El mucílago de cacao es el subproducto que no es aprovechado durante el proceso de cosecha, este cuenta con un exceso de pulpa el proceso de fermentación del grano de cacao (Afolabi, Ibitoye, & Agbaje, 2015). En la fermentación si se tiene una cantidad excesiva de mucílago esto puede hacer que la almendra se perjudique, por esta razones se recomienda separar la pulpa excedente para realizar fermentaciones cortas y con mayor eficiencia en cuanto a la calidad del producto (Kongor *et al*., 2016).

El mucílago tiene un alto valor nutricional lo que permite la innovación de nuevos productos, además puede llegar a ser otra alternativa de ingresos económicos para los productores y la agroindustria. Por otra parte, cuando al mucílago es tratado de manera adecuada contribuye con la disminución de la contaminación del suelo y las plantas (Thi & Tien, 2016). Cabe mencionar que el mucílago es utilizado para la elaboración de bebidas alcohólicas (Sanchez et al., 2019).

Tabla 2. Composición química del Mucílago

Componente	% p/p (base húmeda)
Agua	79,2 – 84,2
Proteína	0,09 – 0,11
Azúcares fermentables	12,50 – 15,90
Glucosa	11,6 – 15,32
Pectinas	0,9 – 1,19
Ácido cítrico	0,77 – 1,52
Cenizas	0,40 – 0,50

Fuente: (K. Ortiz & Álvarez, 2015)

2.2.1. Azúcares presentes en el mucílago de cacao

La glucosa y la pectina son respectivamente consideradas como dos componentes fundamentales del mucílago del cacao, los cuales están libres de alcaloides y sustancias tóxicas (Afolabi *et al.*, 2015). El mucílago de cacao está compuesto por azúcares con un porcentaje de 10-13%, sales de 8 a 10% y pentosas de un 2 al 3% (K. Ortiz & Álvarez, 2015). Además consta de agua, azúcares fermentables, ácidos no volátiles y fibras. Para

la fermentación es fundamental la presencia de los azúcares fermentables como: glucosa, fructosa y sacarosa, además cuenta con ácidos orgánicos, principalmente el ácido cítrico (Kongor *et al*., 2016).

2.3. Fermentación alcohólica

El proceso de fermentación se puede llevar a cabo a través de procesos discontinuos que estos se consideran en un sistema cerrado, en donde el inóculo debe someterse a diversas fases, en cambio los procesos continuos son sistemas abiertos en que el medio se va añadiendo continuamente al biorreactor o fermentador (Owen P., 1993).

La ecuación química que se da en la fermentación alcohólica por efecto de levadura según Gay-Lussac se presenta a continuación:

$$Glucosa \rightarrow 2\ Dióxido\ de\ Carbono + 2\ Etanol + Energía$$

$$C_6H_{12}O_6 \rightarrow 2CO_2 + C_2H_5OH + Energía$$

En la fermentación existen diversos factores que afectan el proceso de los cuales están: concentración de sustrato, el pH, concentración de nutrientes y la temperatura que es un parámetro que se debe controlar ya que este podría afectar el tiempo de proceso, la concentración final de etanol y las propiedades organolépticas de la bebida (Granadillo & Rodríguez, 2014). Es importante mantener la temperatura en el recipiente de fermentación por debajo de 40 ° C para mantener vivas las levaduras (Dussap & Poughon, 2017). Cuando se tiene unas temperaturas altas esto lleva a estimular el crecimiento de las tasas de metabolismo, provocando una pérdida mayor en los caracteres volátiles, por ende se debe tener en cuenta la temperatura a la que se realiza la fermentación (Robles, Feliciano, & Chirre, 2016).

2.3.1. Microorganismos que intervienen en la fermentación

Las levaduras son microorganismos eucariotas que fermentan una variedad de azúcares de diferentes fuentes, obteniendo como producto final de CO_2 y etanol. Su reproducción es de manera asexual mediante mitosis (Dussap & Poughon, 2017).

Durante el proceso de fermentación alcohólica se utilizan varias levaduras, este proceso es una biorreacción en donde se desintegran los azúcares de las frutas o granos los cuales son convertidos en alcohol y en dióxido de carbono. Estas necesitan de oxígeno, fuentes de carbono orgánico y nitrógeno, temperatura, pH adecuados y otros factores de crecimiento (Aguilar, Espinoza, Cabanillas, & Ávila, 2015). Se ha determinado que las

levaduras son el elemento principal para dicho proceso fermentativo en la obtención de alcoholes, vinos y cerveza entre otras bebidas alcohólicas que se las producen mediante la fermentación de estos microorganismos (Dussap & Poughon, 2017).

Las levaduras son las encargadas de transformar en su totalidad a la glucosa en etanol que también aporta con el aroma final del producto según su genética. Para mejorar el crecimiento de la levadura, a veces se agregan nutrientes adicionales, como fosfato de amonio, en el paso de fermentación (Dussap & Poughon, 2017). Las deficiencias de nutrientes, cambios bruscos de temperatura, concentraciones de levaduras son las principales causas de fermentaciones lentas (Cavaglia et al., 2020).

La levadura responsable del proceso de fermentación alcohólica es la Saccharomyces cerevisiae de origen animal y vegetal, que es la más utilizada para la realización de estos procesos (Vázquez & Dacosta, 2017).

2.3.1.1. *Saccharomyces cerevisiae*

Saccharomyces es un miembro común de la población microbiana, es el organismo más estudiado de la ciencia y el principal productor de etanol comercial (Dussap & Poughon, 2017). Además forma parte de la alimentación de los animales por su elevado contenido de vitaminas, ya que esta luego de la fermentación es recuperada y utilizada como alimento (Suárez, Garrido, & Guevara, 2016). Las altas temperaturas de fermentación inhibirán el crecimiento y metabolismo de la levadura, por lo que se debe establecer una temperatura óptima durante la fase más activa de la fermentación, con el fin de no afectar la concentración de etanol y capacidad de la levadura para consumir los azúcares presentes (Robles et al., 2016).

2.3.1.2. Acetobacter

Las Acetobacter o bacterias acéticas pertenecen al grupo de los microorganismos GRAM (-), las cuales tienen forma elipsoidal y miden aproximadamente 0,4 μm hasta 4,5 de largo y 0,4 hasta 1 μm de ancho, estos se pueden presentar solos en parejas o a su vez encadenas. Este grupo de bacterias necesita de la oxigenación debido a su metabolismo aerobio, utilizan al etanol como su fuente de carbono, en cuanto al pH su crecimiento es de 5 hasta 6.5, aunque cabe mencionar que algunas de sus especies solo llegan hasta 3 de pH (Teneda, 2016). La diversidad microorganismos presentes en un medio de cultivo puede

llegar a dificultar la identificación de las bacterias ácidas que se encuentran presentes (Lagunes, Loiseau, Paredes, Barel, & Guiraud, 2007).

2.3.2. Glucólisis

La glucólisis inicia en el citosol, para luego verse reflejado como la degradación de la glucosa, la fructosa que luego formará el ácido pirúvico (Teneda, 2016).

Dentro de la glucólisis hay dos fases.

1. Primera fases consiste en la transformación de glucosa (C6) en dos moléculas de tres carbonos (C3).
2. Esta segunda fase consiste en la oxidación de las moléculas (c3) las cuales son transformadas a dos moléculas del ácido pirúvico

ATP y NADH + H+.

La reacción es la siguiente:

Glucosa + 2 NAD+ + 2ADP + 2H2PO4 2

Ác. Pirúvico + NADH + 2H+ + 2 ATP+ 2H2O

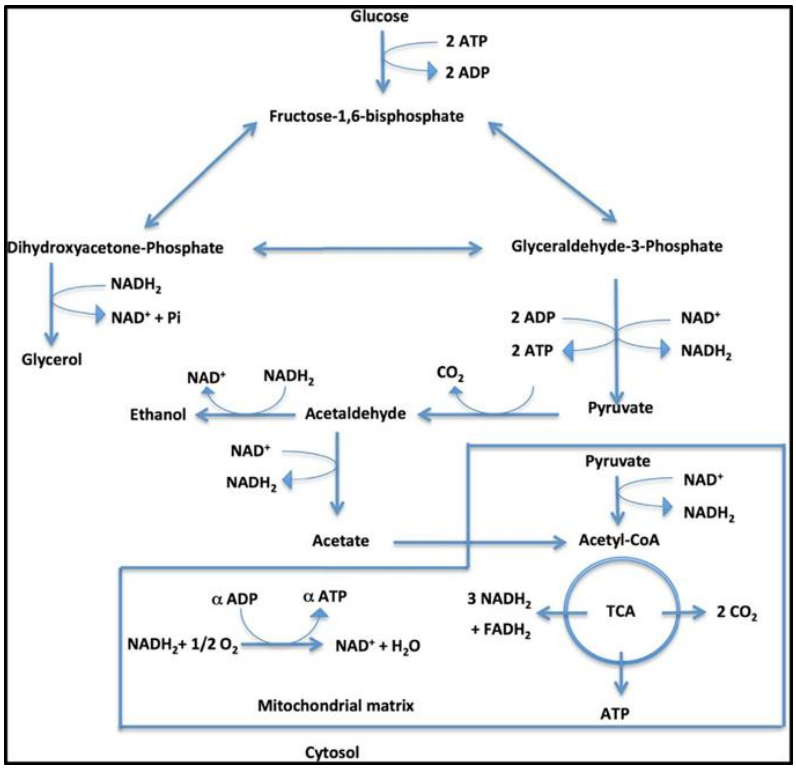


Figura 6. Glucólisis

Fuente: (Dussap & Poughon, 2017)

2.4. Etanol

El etanol es el producto de la fermentación alcohólica que se efectúa por microorganismos que poseen la capacidad de fermentar (Suárez-Machín, Garrido-carralero, & Guevara-Rodríguez, 2016).

Es conocido como Alcohol etílico, melazas y alcohol vínico; su composición líquida incolora y volátil, se presenta también de aroma agradable pudiendo ser extraído de dos maneras: proceso de fermentación de azúcares y por un proceso sintético que parte del etileno (Mosquera & Menéndez, 2006).

Para la producción de etanol en la actualidad ha ido surgiendo innovadoras alternativas con el fin de aprovechar los productos forestales, residuos agrícolas y pastos (Rajak & Banerjee, 2020).

Para producir etanol de primera generación se parte de biomasas como caña de azúcar o maíz. Mundialmente estos son de mayor consumo para obtener bioetanol. De estas dos materias primas la industria realiza la conversión bioquímica se estos carbohidratos en alcohol. Esta tecnología ha sido utilizada desde tiempos muy remotos innovando con el pasar de los años permitiendo el desarrollo industrial y químico (Mosquera & Menéndez, 2006).

CAPÍTULO III

3. METODOLOGÍA

3.1. Ubicación de la investigación

Esta investigación se la realizó en los laboratorios de investigación de la Facultad de Ciencias Químicas y de la Salud de la carrera de Ingeniería en Alimentos de la Universidad Técnica de Machala.

3.2. Preparación de la muestra

El mucílago del grano de cacao se recolectó inmediatamente después de la apertura de las mazorcas de cacao en una finca ubicada en la parroquia de Barbones, cantón El Guabo. Los granos frescos se empacaron en un saco a una altura aproximadamente de un metro del suelo, para facilitar la recolección del mucílago en los recipientes de vidrio. El mucílago de cacao se almacena inmediatamente en un corcho durante el transporte desde el lugar de recolección hasta el laboratorio, para la previa realización de los análisis correspondientes.

3.3. Análisis fisicoquímicos para evaluar el mucílago de cacao

3.3.1. Determinación de pH

La medición del pH en las muestras se realizó mediante el método potenciométrico establecido en la norma INEN, se utilizó un pH-metro Bante901®. En donde se coloca 10 mL de muestra en un vaso de precipitación, se inserta el electrodo en el vaso que contiene la muestra y esperar a que la lectura del equipo sea estable (INEN, 2013b).

3.3.2. Determinación de Acidez

Según norma INEN 12, la determinación de la acidez se la realiza por titulación con una solución valorada de NaOH 0.1 N, se procedió a diluir la muestra utilizando un matraz Erlenmeyer de 250 mL de capacidad, tomando una alícuota de 5 mL de muestra y con una probeta añadir 50 mL de agua destilada libre de CO_2, agitando bien hasta que la dilución quede completamente homogénea y se adicionan 3 gotas de fenolftaleína, hasta la aparición de una coloración rosada persistente (INEN, 2013a). La acidez titulable se expresó como porcentaje de ácido cítrico.

3.3.3. Determinación de Humedad

Para determinar la cantidad porcentual de humedad se realizó mediante el método propuesto por la AOAC 925.10, que consiste en la pérdida de peso de la muestra que se da por calentamiento en la estufa hasta obtener un peso constante.

$$\boldsymbol{Humedad}\ (\%) = \frac{(P3-P1)}{P2}\ x100 \quad \textbf{Ec. 1}$$

Donde:

P1: Peso de cápsula (g)

P2: Peso muestra (g)

P3: P. cápsula + P. muestra seca (g)

3.3.4. Determinación de cenizas

Según norma INEN 533, para determinar cenizas en productos derivados de cacao se procede a realizar en un crisol de porcelana previamente tarado, se pesa 5 g de muestra para luego llevar a la mufla de calcinación a una temperatura de 600 °C, durante 4 horas a peso constante, pasando al desecador para enfriar durante 20 minutos y pesar (INEN, 2013a).

$$\boldsymbol{CENIZAS}\ (\%) = \frac{P1-P0}{Pm} * 100 \quad \textbf{Ec. 2}$$

Donde:

P1: P. crisol + cenizas (g)

P0: Peso del crisol (g)

Pm: Peso muestra (g)

3.3.5. Determinación de azúcares reductores

Se determinó azúcares reductores mediante el método de Miller en donde se utiliza el ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS) y se tomó como referencia la metodología establecida por (Bello, Carrera, & Díaz, 2006). Este método se basa en una reacción que ocurre entre los azúcares reductores y el ácido 3,5-dinitrosalicílico, lo se torna de un color naranja el cual se puede cuantificar colorimétricamente mediante espectrofotómetro UV visible (Canseco, Aráoz, Gusils, & Zossi, 2015).

Para la determinación de los azúcares se realizó una curva de calibración, los patrones a utilizar fueron fructosa y glucosa en las siguientes concentraciones: 200, 400, 600, 800, 1000 ppm. La ecuación de la curva de calibración que se obtuvo fue: **y= 376,62x - 10,318**; donde y = absorbancia (mg/L); x = concentración del sustrato (ppm).

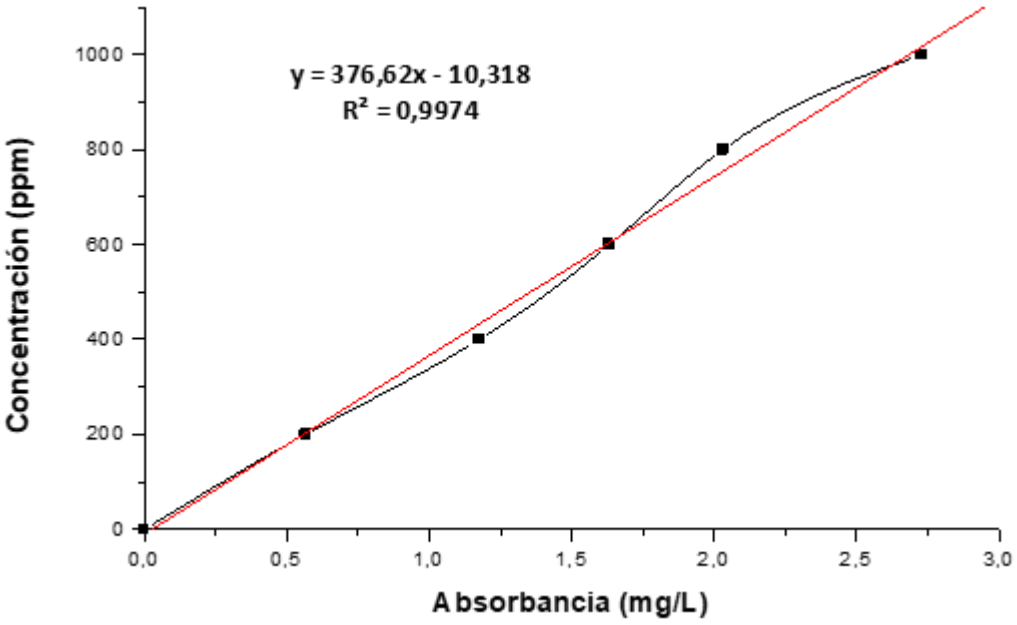


Figura 7. Curva de calibración

Fuente: Autoría propia

3.3. Determinación de etanol

La determinación de la concentración de etanol que se obtuvo durante el proceso de fermentación alcohólica de los azúcares fermentables presentes en el mucílago de cacao, se realizó mediante HPLC. Para la toma de muestra se utilizó un tubo eppendorf y se tomó 1,5 mL de alícuota de la muestra, utilizando un filtro de jeringa de 0.22 µm. El HPLC utilizado fue el modelo Agilent Technologies 1100, equipado con un detector de índice de refracción (G-1362AXR RI), empleando una columna SUPERCOGEL C-610H (Sluiter et al., 2008). La columna a emplear debe estar a temperatura de 50 °C, se utilizó H_2SO_4 5 mM y un caudal de 0,6 mL/min para la fase móvil.

3.4. Diagrama de flujo del proceso de fermentación del mucílago de cacao

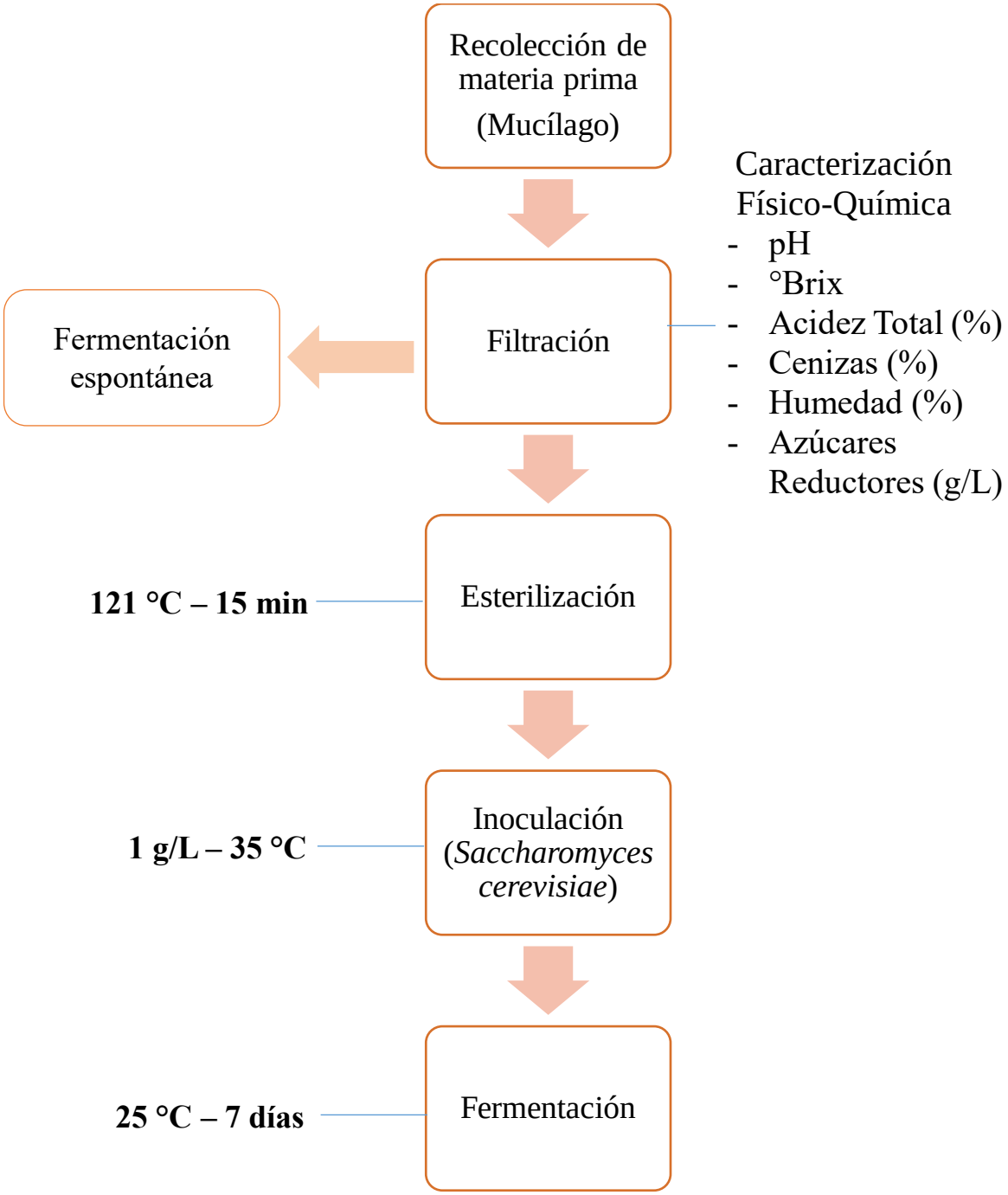


Figura 8. Proceso de fermentación del mucílago de cacao para obtener etanol de segunda generación.

3.4.1. Descripción del proceso

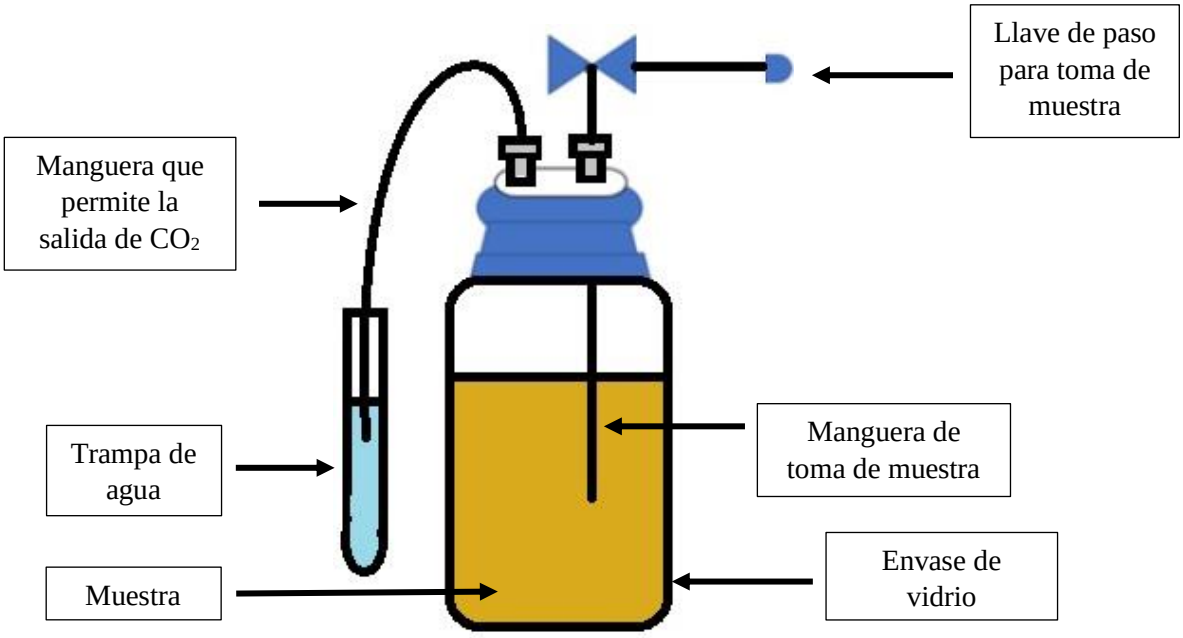
Para el proceso de fermentación se lleva a cabo primero la recolección del mucílago de cacao en condiciones óptimas, pasando por una filtración con la finalidad de eliminar impurezas en el mucílago. Antes de realizar el proceso de fermentación, se analizó el

mucílago de cacao fresco para determinar las características fisicoquímicas tales como pH, °Brix, acidez, humedad, cenizas y contenido de azúcares reductores. Para llevar a cabo la fermentación espontánea, el mucílago de cacao se lo puso en agitación constante a temperatura de 25 °C.

En la fermentación controlada primero se esterilizó en autoclave a temperatura de 121 °C durante 15 minutos. Se dejó enfriar durante una hora hasta llegar a una temperatura de 30 °C, para la inoculación se utilizó levadura *Saccharomyces cerevisiae* comercial (1 g/L) y una solución azucarada al 10%. Se procedió a fermentar a una temperatura de 25 °C en agitación constante utilizando una incubadora, se realizó diferentes tratamientos de fermentación; ajustando pH, adicionando nutriente $(NH_4)_2SO_4$, levadura, y de manera espontánea durante 8 días, en los cuales se llevó un control de pH y cantidad de azúcares cada 24 horas tomando muestra para analizar. El proceso de fermentación se llevó a cabo en frascos de vidrio sellados con tapas, estas fueron modificadas para poder tomar muestras durante el proceso, así mismo, permitir la salida de gas sin afectar el proceso fermentativo, se realizó una trampa de agua con un tubo de ensayo llenado de agua hasta la mitad en donde se depositó la manguera por la cual salía el gas, este sirvió para poder identificar cuando ha finalizado el proceso de fermentación.

La fermentación es un proceso metabólico, en donde se extrae la pulpa de cacao o mucílago con ayuda de microorganismos, las levaduras presentes en el proceso anaerobio degradan los azúcares, produciendo etanol (J. Ortiz et al., 2019).

Figura 9. Diseño del fermentador



3.4. Materiales, reactivos y equipos

3.4.1. Materiales de laboratorio

- Vasos de precipitación de 50 y 250 mL
- Erlenmeyer de 250 mL
- Bureta con soporte
- Pipeta de 10 y 5 mL
- Cápsulas de porcelana
- Crisoles de porcelana
- Balones volumétricos de 25, 100 y 250 mL
- Micropipetas 100 y 1000 µl
- Tubos de ensayo
- Envases de vidrio de 1000 mL
- Desecador
- Celdas de cuarzo

3.4.2. Reactivos

- Hidróxido de sodio 0,1 N
- Fenolftaleína
- ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS)

3.4.3. Equipos

- Balanza Analítica Uni Bloc®
- Thermo Scientific™ Espectrofotómetros Evolution™ 201/220 UV Vis
- Estufa Memmert UN®
- Mufla NABER®
- pHmetro Bante901®

CAPITULO IV

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Evaluación fisicoquímica del mucílago de cacao

Los valores obtenidos de la caracterización fisicoquímica que permitieron identificar la composición inicial del mucílago de cacao utilizado en la presente investigación, se muestran a continuación en la tabla 3:

Tabla 3. *Caracterización fisicoquímica del mucílago de cacao (Theobroma cacao L.).*

	(*Theobroma cacao L.*)
pH	3,70 ± 0,04
Acidez (% ac. cítrico)	1,15 ± 0,05
°Brix	17,40 ± 0,48
Humedad (%)	80,48 ± 0,61
Cenizas (%)	2,15 ± 0,39
Azúcares reductores (%)	16,99 ± 2,03

Se muestran la media de los datos y su desviación estándar (n=3)

Fuente: Autoría propia

En la tabla 2, se presentan los resultados de la evaluación fisicoquímica del mucílago de cacao (*Theobroma cacao L.).* Los valores de pH, brix, humedad y azúcares reductores de la muestra son similares a lo reportado por (Anvoh et al., 2010), sin embargo los porcentajes de cenizas no son comparables con lo reportado por este autor. El total de los sólidos solubles fue de 17,40 °Brix, esta dulzura se debe principalmente a que presenta un alto contenido de azúcares.

En estudio similares donde utilizan mucílago de cacao, Nacional y Trinitario para la obtención de una bebida hidratante, reportan valores de pH de 3,57, acidez 0,88 y sólidos solubles totales 15,07 en *Theobroma cacao L.*, que fueron obtenidos en la localidad de Quevedo, Ecuador (Santana, Vera, Vallejo, & Alvarez, 2019), los cuales difieren con los resultados obtenidos del análisis químico que se realizó en esta investigación, estas variaciones se ven influenciados posiblemente con el lugar de recolección de la muestra, la composición química del suelo, factores climáticos, variedad, entre otros factores.

4.2. Control de los parámetros de pH y azúcares reductores durante el proceso de fermentación del mucílago de cacao.

A partir de los datos iniciales del mucílago de cacao se realizó un seguimiento del proceso fermentativo, disminución del sustrato (azúcares) e incremento del producto (etanol), considerando y monitoreando los cambios que se presentan en términos de pH y azúcares reductores.

4.2.1. Consumo de azúcares durante la fermentación alcohólica

La fermentación alcohólica es la simple conversión de azúcares fermentables a etanol, debido al proceso metabólico de la levadura *Saccharomyces cerevisiae.* A continuación en la **fig. 10** se muestra los resultados del consumo de azúcares por parte de los microorganismos.

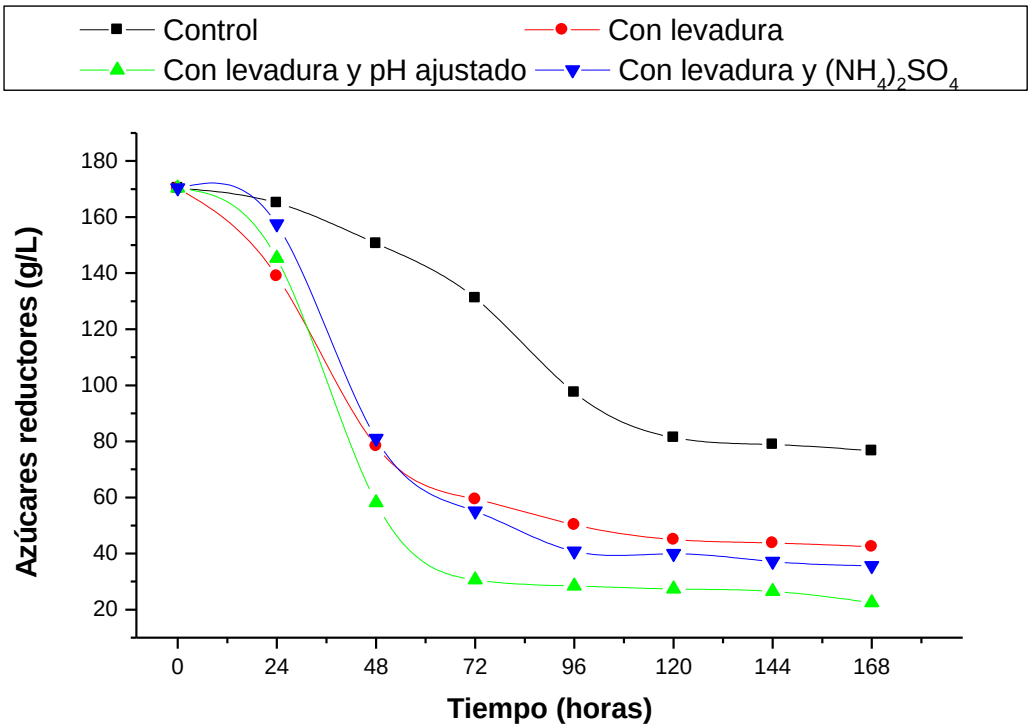


Figura 10. Consumo de azúcares durante la fermentación alcohólica.

(■) **Tratamiento 1:** Fermentación espontánea, (●) **Tratamiento 2:** Fermentación controlada con adición de levadura *S. Cerevisiae*, (▲) **Tratamiento 3:** Fermentación controlada (*S. Cerevisiae)* y pH ajustado, (▼) **Tratamiento 4:** Fermentación controlada (*S. Cerevisiae)* y $(NH_4)_2SO_4$.

Como se puede apreciar en la **fig. 10**, el consumo de azúcares reductores en el proceso de fermentación del mucílago de cacao, empieza cuando se establecen las condiciones

anaerobias a la levadura (1 g/L), se evidenció mayor consumo de azúcares reductores durante las primeras 24 horas con respecto al control. Los tratamientos donde se consumen con mayor rapidez los azúcares reductores son del tratamiento donde se adiciona levadura y el que se ajustó el pH a 4, con respecto a los demás tratamientos que tiene un pH de 3.7.

En un tiempo de fermentación de 72 horas, se evidencia un mayor consumo de azúcares en el tratamiento de pH ajustado (170,36 a 30,61 g/L), a diferencia de los tratamientos; con adición de levadura (170,36 a 59,42 g/L) y con adición de nutriente (170,77 a 55,05 g/L) que su consumo fue menor con un 26,63 g/L, sin embargo se observó que en el tratamiento control la disminución de los azucares reductores fue lenta con respecto a los tratamientos. En la **fig. 10 se** puede ver una clara diferencia entre los comportamientos y que a partir de las 96 horas se ralentizó el proceso de fermentación y durante las 168 horas se estabilizó hasta llegar a consumir casi todo el azúcar fermentable para la producción de etanol, lo que indica que el proceso de fermentación ha finalizado. Según la investigación de Robles *et al*., (2016) esto se debe a que los primeros días la velocidad de reacción es más alta.

Los resultados obtenidos durante el proceso fueron comparados con la investigación de (Luna, 2018), quien reporta valores de consumo similares de 208.8 g/L a 70.9 g/L, durante el proceso de fermentación de 8 días en tratamientos a temperatura de 25 °C. En la investigación de (Anvoh et al., 2010) indica que los parámetros bioquímicos varían de acuerdo con el proceso fermentativo utilizado, ya sea por la composición del jugo y temperatura.

4.2.2. Evaluación de la influencia del pH en la fermentación

El valor de pH que tiene el medio en donde se encuentra la levadura del cual se obtendrá alcohol, determinará el consumo de sustrato y la velocidad de fermentación. Cuando se disminuye la actividad de las levaduras se tiene niveles de pH bajos, por lo que un pH óptimo es cuando el metabolismo de las levaduras es satisfactorio para el consumo de sustrato (Granadillo & Rodríguez, 2014).

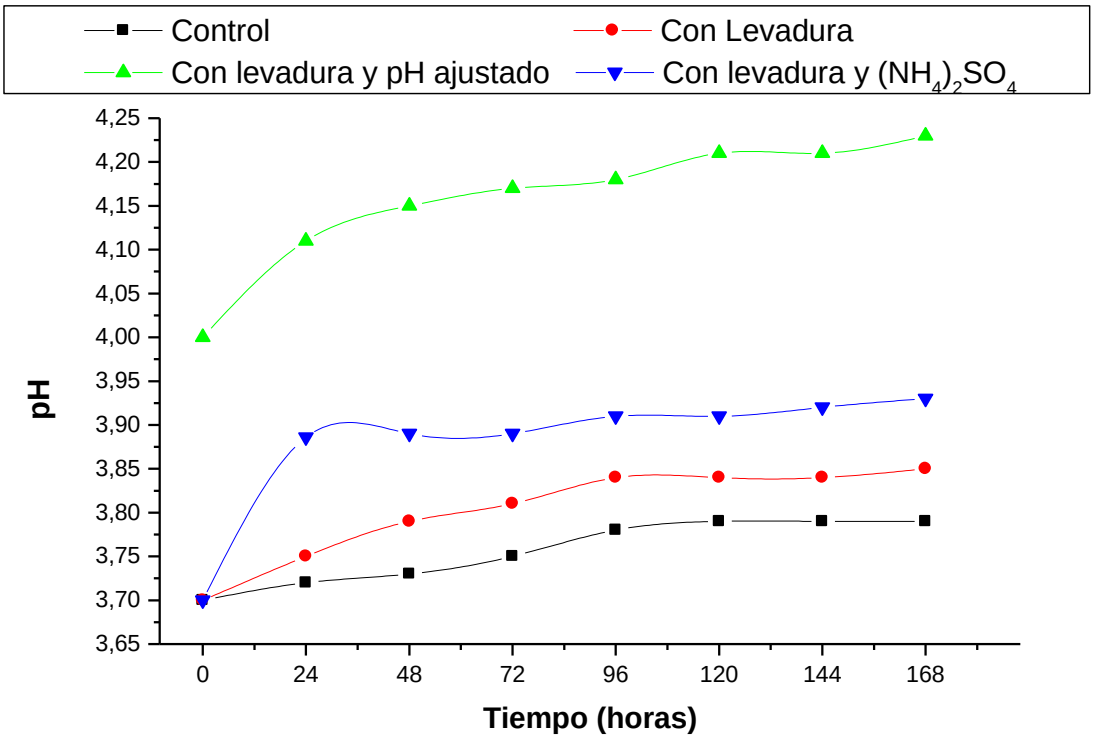


Figura 11. Variación de pH en la fermentación alcohólica de los diferentes tratamientos.

(■) Tratamiento 1: Fermentación espontánea, (●) Tratamiento 2: Fermentación controlada con adición de levadura *S. Cerevisiae*, (▲) Tratamiento 3: Fermentación controlada (*S. Cerevisiae)* y pH ajustado, (▼) Tratamiento 4: Fermentación controlada (*S. Cerevisiae)* y $(NH_4)_2SO_4$.

Fuente: Autoría

La **fig. 11** presenta la variación del valor de pH durante el proceso de fermentación alcohólica, durante las primeras 24 horas transcurridas se refleja que el pH de los tratamientos ascienden de manera regular. En los tratamientos de pH ajustado y el de adición de nutriente lo valores aumentaron de 4 a 4.11 y 3.70 a 3.89 respectivamente, sin embargo en el tratamiento con levadura el incremento del pH con respecto al tratamiento control fue levemente mayor.

En la investigación realizada por Lagunes et al., (2007) durante el proceso de fermentación en el tiempo de 144 horas alcanzó un pH similar (4.48) a lo reportado en nuestra investigación en el tratamiento de pH ajustado. El incremento del pH ajustado se debe a que la levadura (*S cerevisiae)* se encuentra dentro del rango de pH (4 – 5) óptimo de crecimiento (Suárez-Machín et al., 2016).

4.3. Porcentaje de alcohol

El alcohol o etanol que se produce durante la fermentación alcohólica es efectuada por microorganismos que tienen la capacidad de metabolizar los azúcares (glucosa y fructosa) (Suárez-Machín et al., 2016).

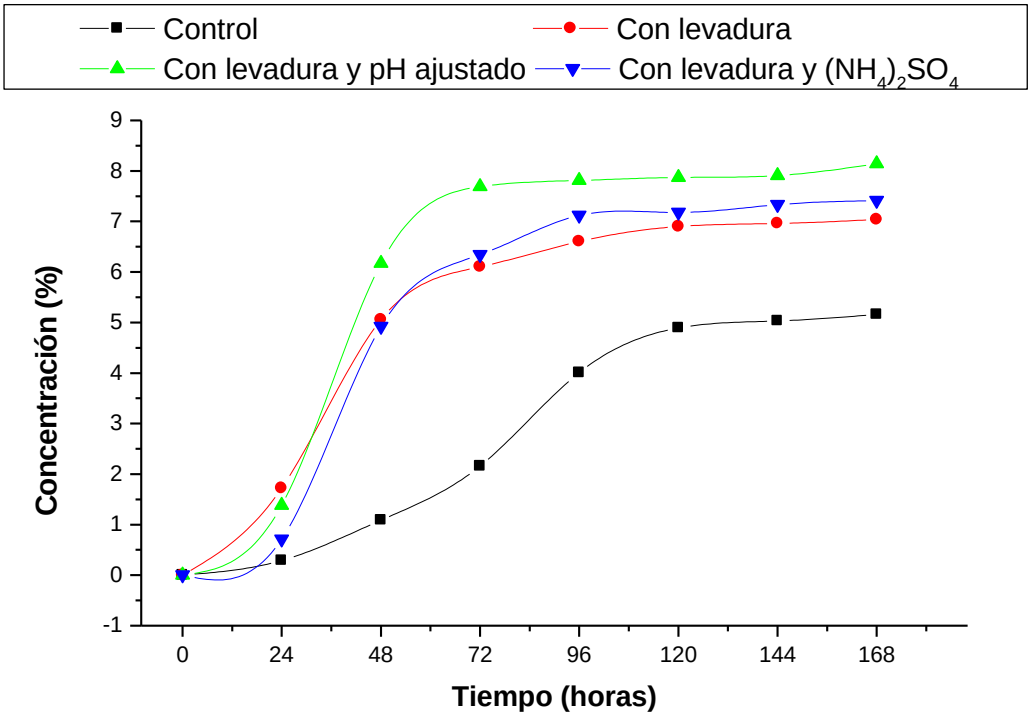


Figura 12. Porcentaje de alcohol en los diferentes tratamientos de fermentación.

(■) Tratamiento 1: Fermentación espontánea, (●) Tratamiento 2: Fermentación controlada con adición de levadura (*S. Cerevisiae)*, (▲) Tratamiento 3: Fermentación controlada (*S. Cerevisiae)* y pH ajustado, (▼) Tratamiento 4: Fermentación controlada (*S. Cerevisiae)* y $(NH_4)_2SO_4$.

Fuente: Autoría

Como se puede apreciar en la **Fig. 12**, muestra las diferentes concentraciones de etanol obtenidos durante 168 horas de fermentación alcohólica, el tratamiento donde se ajustó el pH a 4.0 fue el que produjo mayor contenido de etanol (8,14%), tres puntos porcentuales más con respecto al control. Durante las primeras 48h el porcentaje de formación de alcohol en los tratamientos 2, 3 y 4 se incrementan considerablemente con respecto al tratamiento control. Anvoh et al., (2010), reportan haber obtenido 8.3% de etanol a partir de mucílago de cacao fermentado a 30°C.

Ho, Zhao, & Fleet, (2014), en su investigación indica que durante el proceso de fermentación el tiempo al que alcanza la mayor concentración de etanol es de 72 horas, lo cual se puede comparar con nuestra investigación ya que en el mismo periodo de tiempo se obtuvieron resultados de altas concentraciones.

Durante el proceso de fermentación existen diferentes factores que de manera directa o indirectamente afectan dicho proceso, sin embargo nos centramos en la concentración de sustrato, inóculo y pH.

CAPÍTULO V

CONCLUSIONES

La composición fisicoquímica del mucílago del cacao (*Theobroma cacao L*.) para iniciar el proceso fermentativo fue la siguiente: su pH fue de 3.70, acidez 1.15 %, el °Brix 17.40, humedad 80.48 %, cenizas 2.15 % y los azúcares reductores 16.99 %.

El mucílago de cacao (*Theobroma cacao L.)* es un sustrato con alto contenido de azúcares fermentables que al ser fermentado alcohólicamente produce alrededor de 8% de etanol, el mayor consumo de azúcares fermentables se lleva a cabo durante las primeras 72 horas de fermentación alcohólica.

El mejor desarrollo del proceso fermentativo se logra cuando el medio de cultivo se inicia en un pH de 4 mediante la adición de citrato de sodio, además la adición de sustancias nutritivas al medio, favorece el crecimiento de la levadura y por ende el aumento de la concentración de etanol.

La fermentación espontánea del mucílago de cacao se desarrolla a pH menores a un pH óptimo de la levadura *Saccharomyces cerevisiae*, lo cual indica que al existir otro tipo de microorganismo también hay formación de sustancias de carácter ácido.

BIBLIOGRAFÍA

Afolabi, M. O., Ibitoye, W. O., & Agbaje, A. F. (2015). Evaluation of Nutritional and Sensory Properties of Cocoa Pulp Beverage Supplemented with Pineapple Juice. *Journal of Food Research*, *4*(6), 58–61. https://doi.org/10.5539/jfr.v4n6p58

Aguilar, J., Espinoza, M., Cabanillas, J., & Ávila, I. (2015). *Evaluación de la cinética de crecimiento de saccharomyces cerevisiae utilizando un medio de cultivo a base de melaza de caña y suero lácteo*. *5*(1), 37–47. https://doi.org/10.17268/agroind.science.2015.01.04

Andrade, J., Rivera, J., Chire, G. C., & Ureña, M. O. (2019). Propiedades físicas y químicas de cultivares de cacao (Theobroma cacao L.) de Ecuador y Perú. *Enfoque UTE*, *10*(4), 1–12. https://doi.org/10.29019/enfoque.v10n4.462

Anvoh, K., Guéhi, T., Beugré, G., Kinimo, J., & Gnakri, D. (2010). Comparison of biochemical changes during alcoholic fermentation of cocoa juice conducted by spontaneous and induced processes for the production of ethanol. *African Journal of Food, Agriculture, Nutrition and Development*, *10*(6). https://doi.org/10.4314/ajfand.v10i6.58070

Anvoh, K., Zoro Bi, A., & Gnakri, D. (2009). Production and characterization of juice from mucilage of cocoa beans and its transformation into marmalade. *Pakistan Journal of Nutrition*, *8*(2), 129–133. https://doi.org/10.3923/pjn.2009.129.133

Anzules, V., Borjas, R., Castro, Vi., & Julca, A. (2018). *Caracterización de fincas productoras de cacao (Theobroma cacao L.) en Santo Domingo de Los Tsáchilas, Ecuador*. *8*(2), 39–50.

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. *Icidca*, *40*, 45–50.

Campos, R., Nieto, K., & Oomah, D. (2018). Cocoa (Theobroma cacao L.) pod husk: Renewable source of bioactive compounds. *Trends in Food Science and Technology*, *81*(January 2019), 172–184. https://doi.org/10.1016/j.tifs.2018.09.022

Canseco, M., Aráoz, J., Gusils, C., & Zossi, S. (2015). Validación de metodología para determinación de azúcares reductores totales en vinos fermentados. *Revista Industrial y Agrícola de Tucumán*, *92*(2), 33–38.

Cavaglia, J., Schorn-García, D., Giussani, B., Ferré, J., Busto, O., Aceña, L., … Boqué, R. (2020). ATR-MIR spectroscopy and multivariate analysis in alcoholic fermentation monitoring and lactic acid bacteria spoilage detection. *Food Control*, *109*(October 2019), 106947. https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2019.106947

Chávez, R., Carbo, S., García, E., & Cobos, F. (2019). Estudio socio-económico del cultivo de cacao (theobroma cacao l.) en la parroquia Febres Cordero, Cantón Babahoyo Los Ríos-Ecuador. *Revista Observatorio de La Economía Latinoamericana (on-Line)*. Retrieved from https://www.eumed.net/rev/oel/2019/02/cultivo-cacao-ecuador.html

De La Cruz, J., Vargas, M. ., & Del Angel, O. . (2009). Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO). Cacao: Operaciones Poscosecha. *Fao*, 1–78.

Dussap, C. G., & Poughon, L. (2017). Microbiology of Alcoholic Fermentation. *Current Developments in Biotechnology and Bioengineering: Food and Beverages Industry*, 263–279. https://doi.org/10.1016/B978-0-444-63666-9.00010-8

Figueira, A., & Alemanno, L. (2009). Theobroma cacao cacao. In *Biotechnology of fruit and nut crops* (Vol. 7, pp. 639–669). https://doi.org/10.1079/9780851996622.0639

Granadillo, I. L., & Rodríguez, G. T. (2014). Efecto de la temperatura y el pH en la fermentación del mosto de Agave cocui. *Multiciencias*, *14*(4), 375–381.

Ho, V. T. T., Zhao, J., & Fleet, G. (2014). Yeasts are essential for cocoa bean fermentation. *International Journal of Food Microbiology*, *174*, 72–87. https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2013.12.014

INEN. (2013a). Cacao. (Productos Derivados). Determinación de ceniza total. *NormaTécnica Ecuatoriana NTE INEN 533:2013 Primera Revisión*.

INEN. (2013b). Productos Vegetales y frutas - Determinación de pH (IDT). *Norma Técnica Ecuatoriana Nte Inen-Iso 1842:2013*, *1991*. https://doi.org/10.1016/S0039-9140(03)00007-9

Kongor, J. E., Hinneh, M., de Walle, D. Van, Afoakwa, E. O., Boeckx, P., & Dewettinck, K. (2016). Factors influencing quality variation in cocoa (Theobroma cacao) bean flavour profile - A review. *Food Research International*, Vol. 82, pp. 44–52. https://doi.org/10.1016/j.foodres.2016.01.012

Lagunes, S., Loiseau, G., Paredes, J. L., Barel, M., & Guiraud, J. P. (2007). Study on the microflora and biochemistry of cocoa fermentation in the Dominican Republic. *International Journal of Food Microbiology*, *114*(1), 124–130. https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2006.10.041

Leon, F., Calderon, J., & Mayorga, E. (2016). Estrategias para el cultivo, comercialización y exportación del cacao fino de aroma en Ecuador / Strategies for cultivation, marketing and export of aroma fine cocoa in Ecuador. *Ciencia Unemi*, *9*(18), 45. https://doi.org/10.29076/issn.2528-7737vol9iss18.2016pp45-55p

Luna, T. (2018). *Producción de etanol a partir de mucílago de cacao (Theobroma cacao) mediante fermentación alcohólica*.

Navia, A., & Pazmiño, N. (2012). Mejoramiento de las Características Sensoriales del Cacao CCN51 a través de la Adición de Enzimas durante el Proceso de Fermentación. *Revista Amazónica Ciencia y Tecnología*.

Ordoñez, S., Vera, J., & Tigselema, S. (2019). Cascarilla de cacao (Theobroma Cacao L.) De líneas híbridas para la elaboración de rehiletes de chocolate. *Universidad y Sociedad*, *9*(2), 313–318.

Ortiz, J., Chungara, M., Ibieta, G., Alejo, I., Tejeda, L., Peralta, C., … Peñarrieta, M. (2019). Determinación De Teobromina, Catequina, Capacidad Antioxidante Total Y Contenido Fenólico Total En Muestras Representativas De Cacao Amazónico Boliviano Y Su Comparación Antes Y Después Del Proceso De Fermentación. *Revista Boliviana de Química*, *1*(36.1), 40–50. https://doi.org/10.34098/2078-3949.36.1.4

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

los suelos de (Theobroma cacao L .). *19*(1), 65–84. https://doi.org/10.17151/bccm.2015.19.1.5

Owen P., W. (1993). *Biotecnologia de la Fermentacion*. 274.

Perez, D. (2016). Energy sustainability of Ecuadorian cacao export and its contribution to climate change. A case study through product life cycle assessment. *Journal of Cleaner Production*, *112*, 2560–2568. https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2015.11.003

Rajak, R. C., & Banerjee, R. (2020). An innovative approach of mixed enzymatic venture for 2G ethanol production from lignocellulosic feedstock. *Energy Conversion and Management*, *207*(January), 112504. https://doi.org/10.1016/j.enconman.2020.112504

Robles, R., Feliciano, O., & Chirre, J. H. (2016). Estudio del consumo de azúcares reductores durante la fermentación alcohólica del mosto de uva Italia para la obtención de vino blanco. *Industrial Data*, *19*(2), 104. https://doi.org/10.15381/idata.v19i2.12842

Romero, T., Cuervo, J., Robles, V., Rangel, E., & López, P. (2018). Experimental and Kinetic Production of Ethanol Using Mucilage Juice Residues from Cocoa Processing. *International Journal of Chemical Reactor Engineering*, *16*(11), 1–16. https://doi.org/10.1515/ijcre-2017-0262

Sanchez, D., Castro, D., Rodriguez, W., & Trujillo, E. (2019). Respuesta Agronómica de Mucílago de Cacao (Theobroma cacao L.) en cultivo de maíz (Zea mays L.). *Ciencia En Desarrollo*, *10*(2). https://doi.org/10.19053/01217488.v10.n2.2019.7958

Sánchez, F., Medin, M., Díaz, G., Ramos, R., Vera, J., Vásquez, V., … Onofre, R. (2015). Potencial sanitario y productivo de 12 clones de cacao en ecuador. *Revista Fitotecnia Mexicana*, *38*(3), 265–274.

Santana, P., Vera, J., Vallejo, C., & Alvarez, A. (2019). Mucílago de cacao, nacional y trinitario para la obtención de una bebida hidratante. *UNIVERSIDAD, CIENCIA y TECNOLOGÍA*, *04*(April 2019), 179–189. Retrieved from https://www.uctunexpo.autanabooks.com/index.php/uct/article/view/24/27

Siedentopp, U. (2009). El cacao, planta medicinal y de deleite Cacao – precious protector for heart and blood vessels. *Revista Internacional de Acupuntura*, *3*, 197–200.

Sluiter, A., Hames, B., Ruiz, R., Scarlata, C., Sluiter, J., & Templeton, D. (2008). *Determination of Sugars , Byproducts , and Degradation Products in Liquid Fraction Process Samples Laboratory Analytical Procedure (LAP) Issue Date : 12 / 08 / 2006 Determination of Sugars , Byproducts , and Degradation Products in Liquid Fraction Proce*. (January).

Suárez-Machín, C., Garrido-carralero, N. A., & Guevara-Rodríguez, C. A. (2016). Levadura Saccharomyces cerevisiae y la producción de alcohol. Revisión bibliográfica. *ICIDCA. Sobre Los Derivados de La Caña de Azúcar*, *50*(1), 20–28.

Thi, N., & Tien, N. (2016). A Study of wine fermentation from mucilage of cocoa beans (Theobroma cacao L .). *Dalat University Journal of Science*, *6*(3), 387–397.

Vargas, P., Ciobotă, V., Salinas, W., Kampe, B., Aponte, P., Rösch, P., … Ramos, L. (2016). Distinction of Ecuadorian varieties of fermented cocoa beans using Raman spectroscopy. *Food Chemistry*, *211*, 274–280.

https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.05.017

Vásquez, Z. S., de Carvalho Neto, D. P., Pereira, G. V. M., Vandenberghe, L. P. S., de Oliveira, P. Z., Tiburcio, P. B., … Soccol, C. R. (2019). Biotechnological approaches for cocoa waste management: A review. *Waste Management*, Vol. 90, pp. 72–83. https://doi.org/10.1016/j.wasman.2019.04.030

Zingiber, G. (1995). *El cacao, planta medicinal y de deleite Cacao – precious protector for heart and blood vessels*. 1–7.

ANECACAO. (2015). Asociación Nacional de Exportadores de Cacao -Ecuador. Obtenido de http://www.anecacao.com/es/quienes-somos/cacao-nacional.html

ANECACAO. (27 de abril de 2019). Asociación Nacional de Exportadores de Cacao. http://www.anecacao.com/index.php/es/noticias/exportaciones-de-cacao-subieron-4-65-en-2018.html

Cardona, L., Eduardo, R., & Cadena, E. (2016). Diagnóstico de las prácticas de beneficio del cacao en el departamento de Arauca. Revista Lasallista de Investigación, 13(1), 94-104. Obtenido de https://www.redalyc.org/pdf/695/69545978009.pdf

Chire, G., Verona, P., & Guzmán, J. (2016). Cambios en el color durante el beneficio del grano de cacao (Theobroma cacao L.) peruano procedente de Piura. Ciencia e Investigación, 19(1), 29-34.

León, F., Calderón, J., & Mayorga, E. (2016). Estrategias para el cultivo, comercialización y exportación del cacao fino de aroma en Ecuador. Revista Ciencia UNEMI, 9(18), 45-55. https://dialnet.unirioja.es/descarga/articulo/5774752.pdf.

MAG. (8 de abril de 2019). Ministerio de Agricultura y Ganadería. Obtenido de Ante la ICCO, Ecuador defenderá porcentaje asignado para exportar cacao nacional fino de aroma: https://www.agricultura.gob.ec/ante-la-icco-ecuador-defendera-porcentaje-asignado-para-exportar-cacao-nacional-fino-de-aroma/

Martínez, R., & García, J. (2017). Análisis del desarrollo de la agroindustria local ecuatoriana y su relación con el potencial territorial. Revista Ciencia UNEMI, 10(25), 45 - 54. http://ojs.unemi.edu.ec/index.php/cienciaunemi/article/view/620

Mosquera, J. T., & Menéndez, M. C. (2006). Alcohol etílico: Un tóxico de alto riesgo para la salud humana socialmente aceptado. Rev Fac Med Univ Nac Colomb, 54(1). http://www.scielo.org.co/pdf/rfmun/v54n1/v54n1a05.pdf

Osorio, M., Leiva, E., & Ramírez, R. (2017). Crecimiento de plántulas de cacao (Theobroma cacao L.) en diferentes tamaños de contenedor. Revista de Ciencias Agrícolas, 34(2), 73 - 82. doi:http://dx.doi.org/10.22267/rcia.173402.73.

Peña, J., Azpeitia, A., Mirafuentes, F., Ruíz, V., & Sáenz, L. (2016). Incremento de embriones somáticos de Cacao (Theobroma cacao L.) en sistema de inmersión automático. Ecosistemas y Recursos Agropecuarios, 3(8), 215-224. Obtenido de http://www.scielo.org.mx/pdf/era/v3n8/2007-901X-era-3-08-00215.pdf

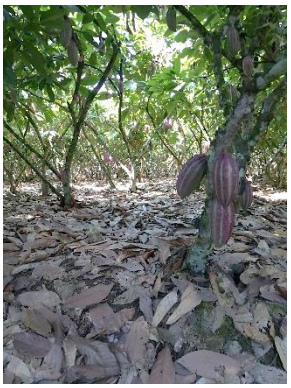
Pontes, K., Caetano, G., Müller, C., Ana, L., Giudici, R., Maxwell, G., Olitta, T. (2019). Capítulo Tres - Avances en fermentaciones alcohólicas de levadura para la producción de bioetanol, cerveza y vino. ScienceDirect, 109, 61-119. Obtenido de https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0065216419300383#!

Salous, E. A. (2019). Acceleration of cocoa fermentation through the action of bacteria (Acetobacter aceti) and yeast (Saccharomyces cerevisiae)[1]. Espirales revista multidisciplinaria de investigación científica, 3(28), 1-20. http://www.revistaespirales.com/index.php/es/article/view/572/html

Teneda, W. (2016). Mejoramiento del Proceso de Fermentación del Cacao ción del Cacao Variedad Nacional y Variedad CCN51. Universidad Internacional de Andaluca.

Teneda, W., Guamán, M., & Oyaque, S. (2019). Exploración de la intención de consumo de la Cascarilla de cacao (Theobroma cacao L.) como infusión: caso Tungurahua-Ecuador*. Cuadernos de Contabilidad, 20(50), 1-12. doi: https://doi.org/10.11144/Javeriana.cc20-50.eicc

ANEXOS



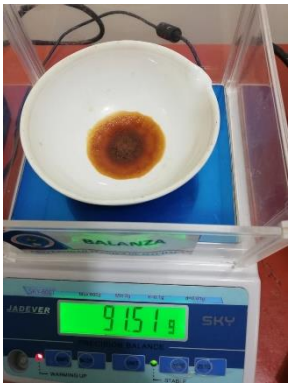
Anexo 5. Finca de cacao en la Parroquia de Barbones

Anexo 4. Acondicionamiento de la materia prima.

Anexo 6. Recolección del mucílago de cacao.

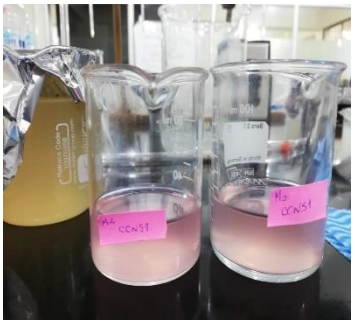
Anexo 7. Determinación de pH.

Anexo 8. Determinación de porcentaje de cenizas.



Anexo 9. Determinación del porcentaje de humedad.

Anexo 3. Determinación de °Brix.



Anexo 2. Determinación de la acidez titulable

Anexo 1. Patrones de la curva de calibración.

Anexo 11. Reactivo: ácido 3,5-dinitrosalicílico

Anexo 10. Esterilización del mucílago.

Anexo 12. Fermentadores