



FACULTAD DE INGENIERÍA Y CIENCIAS APLICADAS

“ANÁLISIS COMPARATIVO DE LA DIVERSIDAD MICROBIANA Y LA
PRODUCCIÓN DE COMPUESTOS BIOQUÍMICOS DE CACAO (*Theobroma
cacao L.*) VARIEDADES NACIONAL Y TRINITARIO CCN-51 DURANTE LA
FERMENTACIÓN”

AUTORES

Aleydi Natalia Muñoz Moya
Sebastián Andrés Gómez Pinos

AÑO
2020



FACULTAD DE INGENIERÍA Y CIENCIAS APLICADAS

ANÁLISIS COMPARATIVO DE LA DIVERSIDAD MICROBIANA Y LA
PRODUCCIÓN DE COMPUESTOS BIOQUÍMICOS DE CACAO
(*Theobroma cacao* L.) VARIEDADES NACIONAL Y TRINITARIO CCN-51
DURANTE LA FERMENTACIÓN

Trabajo de Titulación presentado en conformidad con los requisitos
establecidos para optar por el título de Ingenieros Agroindustrial y de
Alimentos

Profesora Guía
Dra. Viviana del Rocío Yáñez Mendizábal

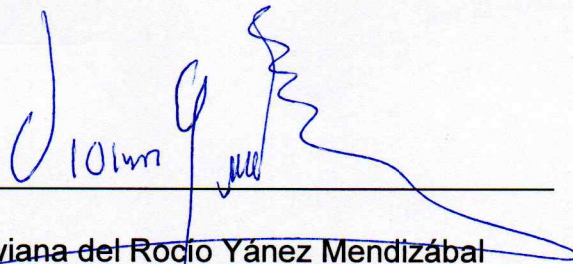
Autores
Aleydi Natalia Muñoz Moya
Sebastián Andrés Gómez Pinos

AÑO

2020

DECLARACIÓN DEL PROFESOR GUÍA

“Declaro haber dirigido este trabajo, Análisis comparativo de la diversidad microbiana y la producción de compuestos bioquímicos de cacao (*Theobroma cacao* L.) variedades Nacional y Trinitario CCN-51 durante la fermentación, a través de reuniones periódicas con los estudiantes Aleydi Natalia Muñoz Moya y Sebastián Andrés Gómez Pinos, orientando sus conocimientos y competencias para un eficiente desarrollo del tema escogido y dando cumplimiento a todas las disposiciones vigentes que regulan los Trabajos de Titulación”.


A handwritten signature in blue ink, appearing to read 'Viviana del Rocio Yáñez Mendizábal', is written over a horizontal line. The signature is stylized and extends to the right of the line.

Viviana del Rocio Yáñez Mendizábal
Doctora en Ciencias y Tecnología Agraria y Alimentaria

C.I.: 1710469782

DECLARACIÓN DEL PROFESOR CORRECTOR

"Declaro haber revisado este trabajo, Análisis comparativo de la diversidad microbiana y la producción de compuestos bioquímicos de cacao (*Theobroma cacao* L.) variedades Nacional y Trinitario CCN-51 durante la fermentación, de los estudiantes Aleydi Natalia Muñoz Moya y Sebastián Andrés Gómez Pinos, en el semestre 202010, dando cumplimiento a todas las disposiciones vigentes que regulan los Trabajos de Titulación".



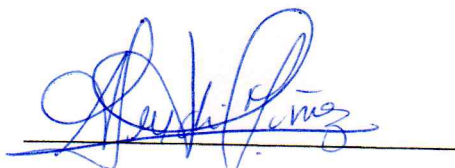
María Raquel Meléndez Jácome

Máster en Protección Vegetal y Fito farmacia

CI.: 1709384067

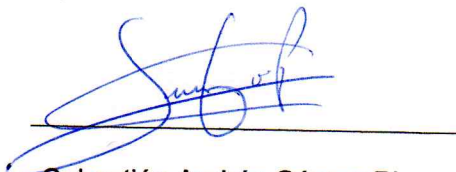
DECLARACIÓN DE AUTORÍA DE LOS ESTUDIANTES

“Declaramos que este trabajo es original, de nuestra autoría, que se han citado las fuentes correspondientes y que en su ejecución se respetaron las disposiciones legales que protegen los derechos de autor vigentes”.



Aleydi Natalia Muñoz Moya

Ci.: 1718948324



Sebastián Andrés Gómez Pinos

Ci.: 1725150385

AGRADECIMIENTOS

Agradecemos a la Universidad de Las Américas y a la Universidad de las Fuerzas Armadas por el apoyo y financiación del proyecto AGR.VYM.18.04.

Agradecemos a COFINA– República del Cacao por abrirnos las puertas y permitimos utilizar sus instalaciones a lo largo de nuestra Tesis.

Agradecemos al Ministerio del Ambiente del Ecuador por la autorización de acceso a recursos genéticos a través del Contrato Marco N°. MAE-DNB-CM-2018-0101.

AGRADECIMIENTOS

Un especial agradecimiento a la Dra. Viviana Yáñez y al Dr. César Falconí por sus conocimientos impartidos durante todo el proceso del trabajo de titulación.

Agradecemos a MBA. Genoveva Granda por apoyarnos con sus conocimientos en bioquímica y por la paciencia que nos tuvo en el laboratorio.

Finalmente, agradecemos a nuestras familias, amigos y docentes que nos guiaron y apoyaron a lo largo de este camino.

DEDICATORIA

Dedico este trabajo a mi familia, a mis padres, hermanas y a mis abuelitos (paternos y maternos), quienes durante todo este tiempo siempre me apoyaron incondicionalmente. Gracias por todo el cariño, por el amor recibido durante esta etapa de vida, fueron el motor para no darme por vencida. Gracias por ser un gran ejemplo de superación, este trabajo también es para ustedes, no saben lo importante que son para mí.

Aleydi Muñoz

DEDICATORIA

Dedico este trabajo:

A mi madre, que con su amor, comprensión y constancia ha hecho de mí un hombre de bien y de verdaderos valores morales.

A mi padre, que más que un padre es un gran amigo, ha sabido guiarme en la vida y a luchar y vencer las dificultades con su cariño y entendimiento.

A mi abuelita Ruth, que con su amor y apoyo incondicional me da las fuerzas para ser mejor cada día.

A mi hermana, que todos los días me apoya y logra sacar lo mejor de mí.

Sebastián Gómez

RESUMEN

El presente estudio se enfocó en analizar la diversidad microbiana y su correlación con la generación de compuestos bioquímicos que se generan durante la fermentación de cacao de las variedades Nacional y Trinitario CCN-51. Para ello, muestreos de cacao durante las operaciones de fermentación comercial fueron evaluadas en la localidad de Vinces, provincia de Los Ríos en la empresa COFINA – República del Cacao; junto con el monitoreo de los factores ambientales circundantes. Luego de lo cual, las fluctuaciones de compuestos bioquímicos como ácidos orgánicos, azúcares y polifenoles fueron cuantificadas por HPLC y espectrometría.

En el monitoreo de los factores físicos químicos circundantes se observó que las fluctuaciones en la temperatura ambiental oscilaron entre de 17 °C a 34 °C para la variedad Nacional y entre 23 °C a 34°C para la variedad Trinitario CCN-51. El contenido de humedad del grano de cacao de la variedad Nacional en el primer día de la fermentación fue de 51,67% y el valor del pH fue $5,26 \pm 0,06$. Al cabo de cuatro días, el valor de pH disminuyó a $4,76 \pm 0,07$ y el contenido de humedad decreció a 48.81%. En cambio, el cacao CCN-51 presentó un valor de pH de $5,54 \pm 0,11$ y un contenido de humedad de 52,1%, después de los cuatro días de fermentación el pH disminuyó hasta $4,74 \pm 0,4$ y la humedad cayó igualmente a 47,3%. Dentro de la temperatura interna del cacao se evidenció el aumento de esta desde 26°C hasta 51°C en la variedad Nacional y de 22°C a 42°C en la variedad CCN-51.

Los resultados del análisis HPLC demostraron que el ácido orgánico con más abundancia durante la fermentación en el cacao Nacional fue el ácido láctico con 24,29 mg/g de cacao seco, seguido por los ácidos cítrico (24,24 mg/g), oxálico (16,69 mg/g) y málico (7,70 mg/g). Mientras que en el cacao Trinitario CCN-51 el ácido con mayor presencia fue el ácido cítrico con 52,55 mg/g de cacao seco, seguidos por los ácidos oxálico (19,69 mg/g), láctico (10,12 mg/g) y málico (8,64 mg/g). El análisis de azúcares demostró que en las dos variedades las concentraciones de fructosa fueron las más altas con 11,38 mg/g de cacao seco en la variedad Nacional y 11,34 mg/g de cacao seco en la variedad CCN-51, seguido por la sacarosa y la glucosa. En donde la sacarosa

se mantuvo constante durante toda la fermentación. En los ácidos fenólicos o polifenoles se encontró mayor presencia de estos en el cacao Trinitario CCN-51 que en el cacao Nacional. Paralelamente, la caracterización y cuantificación de la dinámica poblacional de microorganismos en función del tiempo demostraron que los microorganismos con dominancia durante la fermentación fueron levaduras tales como *Saccharomyces cerevicea*, *Hanseneispora oportunitae*, *Candida krusei* y *Pichia kudriavzevii*, estas fueron abundantes durante los primeros dos días de la fermentación. Seguidos por bacterias como *Lactobacillus* spp. y *Acetobacter* spp., además se identificaron bacterias esporuladas del género *Bacillus* al final de la fermentación. Asimismo, se detectó hongos filamentosos y esporulados en mayor concentración al final de la fermentación, tales como *Aspergillius* spp. y *Fusarium* spp.

Estos resultados demostraron, que para ambas variedades de cacao existe una correlación directa entre los compuestos bioquímicos cuantificados (ácidos orgánicos y azúcares) y los microorganismos caracterizados. Con respecto a los polifenoles no se determinó una correlación entre los microorganismos identificados y las concentraciones de este compuesto.

Palabras Claves: cacao Nacional, cacao Trinitario CCN-51, fermentación, HPLC, microorganismos fermentativos.

ABSTRACT

The present study focused on analyzing microbial diversity and its correlation with the generation of biochemical compounds that occur during cocoa fermentation of the National and Trinitarian CCN-51 varieties. For this, cocoa samples were evaluated during commercial fermentation operations at COFINA company - República del Cacao, in Vinces, province of Los Ríos; together with the monitoring of the surrounding environmental factors. After which, the fluctuations of biochemical compounds such as organic acids, sugars and polyphenols were quantified by HPLC and spectrometry.

In the monitoring of the surrounding chemical physical factors it was observed that fluctuations in the environmental temperature ranged from 17 ° C to 34 ° C for the National variety and between 23 ° C to 34 ° C for the Trinitarian CCN-51. Variety. The moisture content of the cocoa bean of the National variety on the first day of fermentation was 51.67% and the pH value was 5.26 ± 0.06 . After four days, the pH value decreased to 4.76 ± 0.07 and the moisture content decreased to 48.81%. In contrast, Trinitarian CCN-51 cocoa had a pH value of 5.54 ± 0.11 and a moisture content of 52.1%, after four days of fermentation the pH decreased to 4.74 ± 0.4 and the humidity also fell to 47.3%. Within the internal temperature of the cocoa it was evidenced the increase of this from 26°C to 51°C in the National variety and from 22 °C to 42 °C in the Trinitarian CCN-51 variety.

The results of the HPLC analysis showed that the most abundant organic acid during fermentation in National cocoa was lactic acid with 24.29 mg / g of dry cocoa, followed by citric acids (24.24 mg / g), oxalic (16.69 mg / g) and malic (7.70 mg / g). While in the Trinitarian CCN-51 cocoa the acid with the greatest presence was citric acid with 52.55 mg / g of dry cocoa, followed by oxalic acids (19.69 mg / g), lactic (10.12 mg / g) and malic (8.64 mg / g). The sugar analysis showed that in both varieties the fructose concentrations were the highest with 11.38 mg / g of dry cocoa in the National variety and 11.34 mg / g of dry cocoa in the Trinitarian CCN-51 variety, followed by sucrose and glucose. Where sucrose remained constant throughout the fermentation. In the phenolic acids or polyphenols, a greater presence of these was found in the Trinitarian CCN-51

cocoa than in the National cocoa. In parallel, the characterization and quantification of the microorganism's population dynamics in function of time demonstrated that the microorganisms with dominance during fermentation were yeasts such as *Saccharomyces cerevicea*, *Hanseneispora oportunitae*, *Candida krusei* and *Pichia kudriavzevii*, these were abundant during the first two days of fermentation. Followed by bacteria such as *Lactobacillus* spp. and *Acetobacter* spp., in addition, sporulated bacteria of the genus *Bacillus* were identified at the end of the fermentation. Similarly, filamentous and sporulated fungi were detected in greater concentration at the end of the fermentation, such as *Aspergillius* spp. and *Fusarium* spp

These results demonstrated that for both cocoa varieties there is a direct correlation between the quantified biochemical compounds (organic acids and sugars) and the characterized microorganisms. With respect to polyphenols, a correlation between the identified microorganisms and the concentrations of this compound was not determined.

Keywords: National cocoa, Trinitarian CCN-51 cocoa, fermentation, HPLC, fermentative microorganisms.

ÍNDICE

1. CAPITULO I INTRODUCCIÓN	1
1.1. Objetivo general	3
1.2. Objetivos específicos.....	3
2. CAPITULO II MARCO TEÓRICO	4
2.1. Cacao generalidades e importancia agroindustrial.....	4
2.2. Poscosecha	13
2.2.1 Calidad del cacao	13
2.2.2. Factores que influyen la calidad.....	14
2.3. Bioquímica de la fermentación vs diversidad microbiológicas del cacao	17
2.3.1. Generación de compuestos bioquímicos (aromas y sabores).	17
2.3.2. Microbiología	18
3. CAPITULO III METODOLOGÍA	21
3.1. Zona de muestreo.....	21
3.1.1. Toma y procesamiento de muestras de cacao	21
3.2. Análisis Químico	22
3.2.1. Determinación de pH	22
3.2.2. Polifenoles totales.....	23
3.2.3. Ácidos orgánicos (ácido láctico, cítrico, málico y oxálico).....	23
3.2.4. Azúcares (glucosa, sacarosa y fructosa)	24
3.3. Análisis Microbiológico	25
3.3.1. Dinámica poblacional.....	25
3.3.2. Identificación microbiota	25
3.4. Análisis estadístico	26
4. CAPITULO IV RESULTADOS Y DISCUSIÓN	26
4.1. Parámetros bioquímicos	27
4.2. Ácidos Orgánicos.....	29
4.3. Azúcares	32
4.4. Polifenoles totales.....	35

4.5.	Dinámica Poblacional	37
4.6.	Microorganismos	39
4.6.1.	Levaduras	39
4.6.2.	Bacterias.....	45
4.6.3.	Hongos esporulantes y filamentosos	52
4.7.	Análisis comparativos de dinámica poblacional, compuestos bioquímicos y factores circundantes durante el proceso de fermentación	55
5.	CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	58
5.1.	Conclusiones	58
5.2.	Recomendaciones	59
	REFERENCIAS	60
	ANEXOS	72

1. CAPITULO I INTRODUCCIÓN

El cacao es una de las materias primas agrícolas de mayor demanda global debido a que es la materia prima indispensable para la elaboración de diversos productos alimentarios y no alimentarios de alto consumo (Andrade, 2015). Según datos de PROECUADOR (2018), el consumo a nivel mundial de chocolate y derivados en el 2017 alcanzó alrededor de 102 mil millones de dólares. En los últimos años la demanda del cacao ha ido en aumento, debido a otras aplicaciones que van desde la fabricación de cosméticos hasta medicamentos (Barrientos, 2015). Para el Ecuador, el cacao es uno de los rubros de mayor importancia, en el año 2018 las áreas cultivadas abarcaron cerca de 560 387 hectáreas involucrando alrededor de 150 000 familias. Asimismo, los ingresos por exportaciones cacaoteras aportaron sobre los 589 millones de dólares, ubicándolo como el tercer producto no petrolero de mayor exportación en el país (Arvelo et al., 2017).

Por este motivo, los sectores productivos continuamente buscan mejoras en el manejo en campo y poscosecha del cacao (De La Cruz Landero, 2015). A nivel de campo, las estrategias en mejora de la producción y calidad del cacao se enfocan en la selección y uso de material genético o variedades finas de cacao para obtener frutos de buena calidad (Brunetto de Galignani et al., 2014). Asimismo, las prácticas sanitarias eficientes para el control de enfermedades; así como el manejo de aspectos climáticos y edáficos. Paralelamente, los procesos de poscosecha que van desde la fermentación hasta la obtención de la pasta de cacao son un punto clave para determinar un grano de alta calidad (Batista, 2009; Falconí y Yáñez, 2007).

En la Poscosecha, la fermentación y el secado de los granos son los procesos que determinan las características organolépticas, para que el cacao sea deseable en el mercado nacional e internacional (Brunetto de Galignani et al., 2014). La importancia de la fermentación radica en que se dan una serie de

reacciones químicas dentro del grano que ayudan a generar compuestos precursores del aroma y sabor. Asimismo, intervienen una variedad de microorganismos, los cuales cumplen funciones específicas en cada día de fermentación, la cual dura entre cuatro a cinco días y finalmente se realiza el secado de los granos (Portillo et al., 2007). Por esto, estudiar la relación entre los compuestos generados durante la fermentación del grano, los microorganismos y el entorno es muy importante para obtener granos de cacao de calidad

En el Ecuador, se cultivan diversas variedades de cacao de cacao fino, principalmente desarrolladas principalmente por el INIAP. Entre las variedades más conocidas el cacao "Nacional" o también denominado Fino de aroma; junto con el cacao Trinitario clon CCN-51 (Colección Castro Naranjal) son las más cultivadas. Ésta posee mayor resistencia a escoba de bruja. Además, el índice de productividad de éste es superior al cacao Nacional, por lo que los productores eligen este clon para ser cultivado (INIAP, 2012).

Actualmente, se está incentivando a cultivar cacao Nacional o Fino de Aroma debido a la demanda creciente de éste, pues, las características organolépticas en cuanto a sabor y aroma son muy diferentes a otras variedades y son más deseadas en el mercado internacional. Según el MAGAP (2018), el Ecuador proveyó al mundo el 60% de la totalidad de la demanda de cacao Nacional. Es así como, en el Ecuador ha existido potencial para el cultivo de esta variedad, pensando que en futuros años se puede proveer mayor cantidad de cacao en general, si se logra tener un mejor manejo en la producción en campo y poscosecha del grano. Teniendo en cuenta que la fermentación del grano es la base para obtener características de sabor y aroma, lo que diferencia de un cacao de buena calidad y otro de calidad baja (Schwan, 1998).

En Vinces, Provincia de Los Ríos, la empresa República de Cacao en Colaboración con COFINA cuenta con su propio centro de acopio, donde

realizan los procesos en Poscosecha del cacao. Con frecuencia como en muchos otros lugares, la materia prima recibida no presenta la calidad deseada; esto se debe a los problemas de estandarización y seguimiento de los procesos de campo que se encuentran entre los productores nacionales de cacao. Es así que, la focalización para obtener cacao de calidad radica en un correcto proceso de fermentación. En donde, se establece la importancia en la identificación de los microorganismos, pues, cumplen un rol fundamental en la transformación de compuestos bioquímicos de los granos de cacao. Asimismo, los microorganismos presentes y los compuestos bioquímicos identificados que fluctúan durante este proceso, otorgarían un gran aporte para desarrollar fermentaciones controladas y estandarizar procesos en la Poscosecha. De esta forma, se aseguran las características organolépticas y físicas del grano de cacao para poder realizar productos de calidad, con valor agregado de alto consumo.

1.1. Objetivo general

Analizar la diversidad microbiana y su influencia en los compuestos bioquímicos en la fermentación de cacao (*Theobroma cacao* L.) de las variedades “Trinitario CCN-51 y “Nacional”

1.2. Objetivos específicos

- Caracterizar la diversidad microbiana involucrada durante la fermentación del cacao (*Theobroma cacao* L.) de las variedades “Trinitario CCN-51 y “Nacional”
- Determinar las fluctuaciones de compuestos bioquímicos en las dos variedades de cacao en HPLC.

2. CAPITULO II MARCO TEÓRICO

2.1. Cacao generalidades e importancia agroindustrial

2.1.1. Historia del cacao

En la actualidad, uno de los productos agroindustriales más apetecibles para el mundo es el chocolate, este producto se desarrolló y expandió a partir del siglo XIX; para la producción de éste se necesita principalmente granos de cacao fermentados. El chocolate se deriva de la palabra azteca “xocolatl”, cuya connotación es “agua espumosa”, la primera evidencia de la utilización de este fruto fue en una bebida o brebaje amargo que se usaba en rituales que sólo los de la alta sociedad podían consumirla; ésta era atribuida con virtudes afrodisiacas y reconstituyentes (Ramírez, 2013) Para los indígenas, el cacao, tenía un valor más apreciado que el oro, el cual también se lo utilizaba como forma de trueque. En la época de la colonización, los españoles adquirieron varias costumbres de la región, una de ellas era tomar una bebida hecha con cacao, la cual, le añadieron azúcar y otras especias y se convirtió en un producto muy apreciado por ellos (Ramírez, 2013).

En el año 1528, Hernán Cortés, fue uno de los pioneros en el descubrimiento del cacao en las civilizaciones indígenas. Una vez adquiridas sus costumbres, herramientas y conocimientos de preparación para este fruto, volvió a España con un cargamento lleno de mazorcas de cacao (Ramírez, 2013) Los granos de éste se encontraban cubiertos de mucílago, los cuales fueron sometidos a varios procesos como fermentación, secado al sol, tostado y prensado. Estos procesos se siguen realizando actualmente. Por un largo tiempo, el “chocolate” tuvo exclusividad en la sociedad española y sólo podían consumir las clases sociales privilegiadas (Ramírez, 2013). Su introducción a otros países europeos no fue hasta 1615, simultáneamente en otros países del sector se dio mediante los jesuitas, a través de una red internacional de conventos y monasterios (Ramírez, 2013). La importancia de este fruto dio lugar a la expansión y cultivo

de este en países de clima tropical alrededor del mundo, gracias al impacto económico generado por los colonizadores (Ramírez, 2013).

En el Ecuador, desde la primera década del siglo XVII se inició la explotación y comercio del cacao. En 1665 empezaron con el intento de exportación con compra fraudulenta a los productores. Ya para 1740, la producción y exportación de cacao daría paso a una lenta alza como producto competitivo en el mercado mundial (Andrade, 2015). En esta época también hubo una fuerte infestación de plagas como la “monilia” y “escoba de bruja” en el cacao, que dieron paso a una caída abrupta de este rubro. Después de la Primer Guerra Mundial, con tal de levantarse como país agrícola, dio paso al surgimiento del banano como alternativa para la reactivación de la economía (Campaña et al., 2017). A finales del siglo XVIII, el auge cacaotero en el Ecuador dio inicio a la integración en el mundo capitalista y abierto al mercado norteamericano y europeo tras la revolución industrial. Con el impulso que marcó esta época, surgieron varios inventos que dieron paso a la industrialización del cacao (Campaña et al., 2017).

- **Taxonomía**

El árbol cacaotero produce un fruto denominado cacao, su nombre científico *Theobroma cacao* L. pertenece a la familia de las Malváceas. Sus frutos son alargados, llamadas mazorcas que contienen de 30 a 40 semillas de color café-rojizo por fuera y cubiertas de mucílago o pulpa blanca de sabor dulce. Éstas se las llama comúnmente granos de cacao y son ricas en nutrientes (Observatorio del Cacao, 2016). Hasta el día de hoy se conocen 18 especies distintas de *Theobroma*, las cuales se diferencian por el tamaño de la planta, su coloración, la forma de los granos, hojas, características nutricionales y organolépticas y el volumen de producción (Reddy et al., 2010). Asimismo, el clima idóneo para el cultivo del cacao oscila entre los 22°C y 30 °C, este rango

de temperatura permite que el cacao tenga un mayor desarrollo vegetativo y de productividad (Miller, 2017).

- **Domesticación**

La domesticación, cultivo y consumo del cacao ocurrió en América del Sur, extendiéndose posteriormente desde América Central a México, llevada a cabo durante el comercio por los nativos americanos. Entre estos, Los Toltecas, Mayas y Aztecas datan su existencia hace unos 2000 años; aunque, investigaciones actuales mencionan que al menos una variedad de cacao tiene su origen hace 5 000 años en la Alta Amazonía (ANECACAO, 2015). Una línea de evidencia sugiere que la ruta de domesticación del árbol de chocolate se dispersó por la cuenca del Amazonas a lo largo de dos rutas, la primera conduciendo al norte y la segunda al oeste (Cornejo et al., 2018).

- **Origen y diversificación de áreas cultivadas**

El cacao es una fruta tropical, sus cultivos se expanden desde América central y Sudamérica. Actualmente, también se lo cultiva en África occidental. Según el MAGAP (2015), en el Ecuador predominan las explotaciones de menos de 50 hectáreas (47%), se estima que el 90% de la producción de cacao de la variedad CCN-51 en su mayoría se efectúa en sistemas tecnificados, mientras que el cacao fino Nacional se realiza en sistemas semitecnificados y convencionales. Entre las dos variedades producidas en el país, existen diferencias importantes, donde la variedad Trinitario CCN-51 registra una mayor productividad y resistencia a ciertas enfermedades y un inicio más temprano de producción. Aunque, la variedad Nacional cuenta ampliamente con una calidad superior (Campaña, 2017).

En el Ecuador, la producción de cacao se centraliza principalmente en las provincias de Los Ríos, Guayas, Manabí y Sucumbíos. Las dos variedades que se cultivan en el país son el cacao Trinitario clon CCN-51 y el denominado Cacao Nacional o también conocido como cacao Fino de Aroma o “Arriba”. Según El Instituto Nacional de Estadística y Censos (INEC) dio detalles de la Encuesta de Superficie y Producción Agropecuaria Continua, donde el país contó con 600.000 hectáreas cultivadas de cacao, en las cuales predomina la variedad Trinitario CCN-51 por su productividad (INEC, 2019).

2.1.2. Producción e Industrialización del cacao

El cacao es cultivado en más de 50 países en regiones cálidas y húmedas, en cuatro continentes (África, Asia, Oceanía y América). En 23 países de América se obtiene cacao con fines comerciales, por lo que el cacao es considerado un cultivo de gran importancia social, económica, ambiental y cultural para las regiones en donde se produce (Arvelo et al., 2017). En el año 2013, Costa de Marfil mantuvo la producción de cacao en dominio seguido por Ghana. Estos países conjuntamente representaron más del 50% de la producción mundial. Aunque generen un volumen superior, los países sudamericanos como Brasil, Perú y Ecuador son reconocidos por la calidad del cacao en cuanto a contenido de azúcares y compuestos aromáticos que influyen en la calidad del chocolate (López y Monzón, 2016).

La industrialización del cacao en los últimos años ha dado paso a una masificación de productos relacionados con este rubro, por lo que países cacaoteros se han visto en la obligación de producir y obtener una materia prima cumpliendo con los estándares de calidad requeridos por los países importadores. Según la ICCO (2019), el Ecuador en el 2018 se localizó entre los principales productores de granos de cacao, representó el 7% de la producción total y ocupó el quinto lugar a nivel mundial. En general, el

continente africano cuenta con el 73.3% lidera la producción mundial, seguido por el continente americano con una participación del 16.7% y Asia y Oceanía con el 9%. En el país el cultivo y comercio de cacao representa un rubro de importancia en la economía, pues, se encuentra dentro de los cinco productos no petroleros de mayor exportación.

Por otro lado, la demanda mundial de cacao Nacional y chocolate de alta gama se basa en las nuevas tendencias que surgen en el consumidor, como una producción orgánica y ecológica que cumplan con certificados de calidad, por lo que su mercado es más específico. Mientras que el cacao CCN-51 se mantiene de la forma con que se ha ido trabajando, por su alta productividad para cubrir el déficit que existe de abastecimiento. Existen grandes amenazas para la industria cacaotera ecuatoriana, entre estas la vulnerabilidad a enfermedades, la alta exposición a los efectos nocivos del cambio climático y las condiciones macroeconómicas que causan grandes efectos sobre la producción del país disminuyendo su competitividad frente al mercado internacional (Acebo, 2016).

- **Manejo en campo**

Para que un árbol cacaotero produzca frutos y semillas de buena calidad, el manejo en campo debe ser bueno. Los árboles de cacao son muy selectivos sobre las zonas donde estos se cultivan. Estos árboles se desarrollan de mejor manera en suelos que contengan un alto contenido de nutrientes (ICCO, 2019). Por lo general, este cultivo no genera una tolerancia hacia el estrés por humedad, por lo que el suelo donde este se lo cultiva debe tener buen drenaje (Ololade et al., 2010). Una vez que la planta se encuentre en pleno crecimiento, se debe realizar los respectivos cuidados para que obtenga los nutrientes necesarios para el desarrollo de los frutos. Asimismo, se debe realizar podas constantes para evitar el crecimiento excesivo, lo que en un futuro ocasiona

problemas en la cosecha (De la Cruz, 2015). El control de plagas y enfermedades se la realiza durante todo el ciclo productivo de la planta, pues, al no controlar los agentes infecciosos de la planta, puede ocasionar frutos de calidad baja o incluso tener una pérdida parcial o total de la cosecha (De la Cruz, 2015).

- **Variedades**

El sabor y aroma de un chocolate se ve influenciado por diversos factores propios de la planta de cacao; así como el sitio donde esta planta está siendo cultivada, las condiciones climáticas, el manejo correcto en campo y una excelente Poscosecha (Brunetto de Galignani et al., 2014). Entre los factores propios de la planta, la variedad y/o genotipo son los que más predominan dentro de las variedades de cacao cultivadas. Las más conocidas son: la variedad Forastero o comúnmente conocida como cacao ordinario, representa el 95% de la producción mundial. Cáceres (2013), resalta que, este cacao se caracteriza por la capacidad de producción en masa, por una alta resistencia a enfermedades y que las plantas no requieren de un manejo intensivo y su sabor es más chocolatoso. Los países donde se cultiva mayormente este tipo de cacao son: Costa de Marfil, Ghana, Nigeria y Camerún. Los granos de este cacao por lo general son planas y de color púrpura debido a las antocianinas presentes (Lima et al., 2011). El chocolate que se elabora con este tipo de cacao no es muy amargo, ni astringente a comparación con el que se elaboran con otras variedades de cacao, esto se debe al alto pH que tienen los granos una vez fermentados y secos (Sukha et al., 2008).

Otra variedad de cacao es el Criollo, el cual es nativo de Sudamérica. Éste se caracteriza por tener un sabor más dulce, por lo cual se vuelve más susceptible a plagas y enfermedades. En Ecuador es llamado cacao Nacional o Fino de Aroma conocido como “Arriba”. El cuidado de este es mayor y el rendimiento

no es muy alto a comparación del cacao Forastero, lo que hace que se incremente su valor (Afoakwa et al., 2013). Las almendras de este cacao poseen una coloración morado pálido o incluso se ha evidenciado que los granos suelen ser de color blanco, esto se debe a que esta variedad tiene un gen que inhibe la antocianina (Ferraó, 2008). Actualmente, este tipo de cacao se lo cultiva únicamente en América central y en regiones de Asia, debido al pH muy bajo que poseen los granos y esto afecta al perfil de sabor de un chocolate (Ortiz de Bertorelli et al., 2009). El cacao criollo es considerado fino y se utiliza principalmente para producir chocolates de amargor leve y de mejor calidad. Los aromas finos incluyen notas frutales (frescas y maduras), herbales, florales, a madera, nueces y a caramelo. Asimismo, los monoterpenos como el linalol también forman parte de los compuestos responsables de aroma; por consiguiente los cacao finos contienen más cantidades de linalol que otros tipos de cacao (Ziegleder, 1990). Estas características convierten a esta variedad en un cacao exclusivo y demandado arduamente en el mercado internacional.

La última variedad de cacao es el Trinitario, el cual es originario de Trinidad y Tobago. Este cacao es un híbrido entre las variedades Forastero y Criollo (Cáceres, 2013). La coloración de los granos de este cacao es variable, e encuentran granos de tonalidades cafés, púrpuras y blancos. Los árboles de esta variedad poseen una resistencia moderada a plagas y enfermedades. Este tipo de cacao presenta características de sabor y aromas únicos, los cuales son muy deseables al momento de elaborar chocolate. Las variedades de cacao Trinitario y Criollo producen granos considerados como “finos” cuya producción alcanza únicamente el 5% de la producción mundial de cacao (ICCO, 2019). Estos tipos de cacao son los que se emplean en la elaboración de chocolate considerado de alta gama.

- **Enfermedades del cacao: monilla y otras**

El cacao es afectado por plagas y enfermedades especialmente fungosas. Entre las enfermedades que generan podredumbre en la fruta de cacao son: la mazorca negra (*Phytophthora palmivora*), la moniliasis (*Moniliophthora roreri*), la escoba de bruja (*Crinipellis pernicioso*) y el mal del machete (*Ceratocystis fimbriata*). Estas enfermedades, particularmente la moniliasis, puede ocasionar hasta un 80% de pérdidas en la producción de la plantación (INIAP, 2011). El manejo agronómico adecuado para las variedades Nacional y Trinitario CCN-51 denotan un mayor énfasis en empleo fitosanidad y en poscosecha, puntos críticos claves para obtener un grano de buena calidad.

- **Chocolate**

El chocolate es considerado un alimento nutricionalmente completo, pues, contiene en carbohidratos un 61%, materia grasa 30%, de proteínas un 6%, y de humedad un 3%, vitaminas y minerales (hierro, fósforo y calcio) aproximadamente. Estos datos van a depender estrechamente del tipo de grano, su variedad y valor agregado del producto. El chocolate se elabora principalmente con licor y manteca de cacao. De igual forma, se modifican las proporciones de sus componentes para obtener los distintos tipos de chocolates, además, se añaden otros ingredientes como azúcar, edulcorantes, saborizantes, leche, entre otros (Flores et al., 2009).

A nivel mundial, el consumo de chocolate en el 2017 alcanzó los USD 102 mil millones y las proyecciones según Euromonitor son que la demanda crecerá un 8% en el 2022 (PROECUADOR, 2018). En el 2017, Bélgica se posicionó como el mayor consumidor de chocolate, siendo 6 kg/año por persona. No obstante, Asia, África y Latinoamérica tienen el 75% de la población mundial, aunque sólo representan el 20% de consumo mundial. En Asia, los países como China e India serán considerados mercados potenciales de consumo en los próximos

años. Asimismo, el consumo de chocolate en algunos países sigue creciendo debido al desarrollo de nuevos productos. El consumo promedio per cápita de chocolate a nivel mundial es de 6,35 kg/año por persona, un 52,12% superior al consumo per cápita promedio de confitería de dulce (azúcar). En Europa, el aumento del consumo de chocolate se debe a los chocolates rellenos (Agell, s/f).

- **Derivados de cacao, alimenticios y no alimenticios**

Las industrias fabricantes de chocolates, galletas y otros productos relacionados con el cacao demandan una gran cantidad de productos semielaborados (como polvo, manteca y licor de cacao). La cantidad va a depender del tipo de producto a realizarse y de la industria misma. En 2017, la producción europea en este sector ascendió a casi 7 millones de toneladas (\$30 mil millones). Según Caobisco (2017) estima que la industria europea de chocolate, galletas y confitería ocupa el 50% de la producción mundial de cacao. Los países con mayor participación fueron Alemania (29% del volumen producido), Italia (18%), Bélgica (8%), Reino Unido (7%) y Francia (6%). Existe también otro sector que se dedica a manufacturar productos que no son para fines alimenticios como en la industria cosmética.

El Ecuador es exportador de cacao en grano, semielaborados o derivados y producto terminado. Según datos del Banco Central del Ecuador, (2016), el país exportó entre enero y julio de 2015 un total \$ 927 mil relacionadas a chocolates y demás preparaciones como tabletas y gránulos hechos con cacao, los cuales fueron destinados a Colombia, Alemania, Estados Unidos, Japón, Suecia, Holanda, Emiratos Árabes, Qatar, entre otros. Sin embargo, los productos terminados obtenidos del Cacao Fino de Aroma (fruto tradicional y emblemático del país, la cual es materia prima reconocida por la industria chocolatera internacional), solamente se exportó entre el 1% y 2% del total enviado (BCE, 2016). Durante 2018, las exportaciones de derivados

representaron el 6.33% del suministro exportable total de cacao y sus productos procesados, con un valor FOB de USD de 47 millones. Los principales destinos de estos productos fueron la Unión Europea y Estados Unidos (ANECACAO, 2019). Estos datos muestran un incremento en la exportación de chocolates y derivados de cacao ecuatoriano hacia el mercado internacional.

Tabla 1.

Exportaciones de derivados de cacao en Ecuador.

Licor o pasta	46.94%
Polvo	28.34%
Manteca	23.36%
Torta	1%
Nibs	0.36%

Adaptado de: (ANECACAO, 2019).

Por otro lado, los derivados de cacao ofrecen tantos beneficios para la piel que son aprovechados para la preparación de productos cosméticos, debido a su alta concentración de antioxidantes y compuestos aromáticos. Éstos en crudo neutralizan los radicales libres, causantes de la oxidación que causan vejez prematura. Estos productos no son con fines alimenticios por lo que su mercado es más específico (Andrade, 2015).

2.2. Poscosecha

2.2.1 Calidad del cacao

La calidad del cacao es una medida objetiva que se determina realizando una prueba física conocida como prueba de corte, en donde se identifica el grado de fermentación en la que el grano de cacao se encuentra. Adicionalmente se realiza un análisis organoléptico para determinar el perfil de sabores y aromas que contiene el grano fermentado y seco (Ortiz de Bertorelli et al., 2009). Según el grado de fermentación de los granos se determinó la siguiente clasificación (figura 1).



Figura 1. Grado de fermentación de los granos de cacao

Adaptado de: (Rubio, 2013).

2.2.2. Factores que influyen la calidad

Un sabor y aromas agradables son características de un cacao de buena calidad. La calidad se ve influenciada por varios factores propios y ajenos de la planta, entre los más importantes están: la variedad o genotipo de cacao que se utiliza al momento de la siembra y el lugar donde se cultiva. Las condiciones climáticas, el adecuado manejo en campo y una excelente poscosecha también influyen para la obtención de un cacao con cualidades positivas para la elaboración de chocolate (Brunetto de Gallignani et al., 2014).

- **Preselección de material genético**

Para obtener frutos de buena calidad y por lo tanto granos de cacao con buenas características organolépticas, se debe elegir correctamente el genotipo y variedades de cacao, esta elección influye al momento de obtener un producto final, tanto en sabor y aroma. En la actualidad se reconoce tres cultivares amplios de cacao que son: Criollo, Forastero y Trinitario, a estos tres cultivares se le puede sumar una cuarta variedad cultivada en Ecuador y otros países Latinoamericanos, conocida como Nacional (Afoakwa et al., 2011a). Existen diferencias entre las variedades en las mazorcas, rendimiento de semillas, rendimiento por hectárea, características de sabor y aroma, resistencia a enfermedades y plagas (Afoakwa et al., 2013).

2.2.3. Fermentación

Una de las tecnologías más antiguas para los alimentos es la fermentación. Se descubrió accidentalmente alrededor de 10000 a.C. y se lo inculcó como método de conservación. Este proceso es producido por microorganismos del medio ambiente o inducidos que transforman los componentes del sustrato, generando enriquecimiento biológico; además, desarrolla diversidad de sabores, aromas y texturas (Soberanía y Módulo, 2015). La fermentación en los granos de cacao a diferencia de otros alimentos es mucho más controlada. Este proceso es uno de los pocos que intervienen microorganismos de forma espontánea, los cuales se desarrollan y permanecen por medio de prácticas tradicionales. Además, requiere de la obtención de las características organolépticas esenciales para que los granos del cacao puedan ser consumidos y posteriormente llevados a la cadena alimentaria y de valor (Ozturk y Young, 2017).

La fermentación de las semillas de cacao se considera el primer paso después de la cosecha para la elaboración de un buen chocolate. Este proceso suele ser empírico y en ocasiones no genera almendras de buena calidad, lo que produce que los fabricantes de productos con cacao en su formulación deban

cambiar está, generando una heterogeneidad en sus productos. La fermentación se lleva a cabo entre cuatro a seis días después de ser cosechado y consiste en la eliminación del mucilago que se encuentra adherido al grano. Simultáneamente se producen cambios en la coloración de los granos debido a los compuestos fenólicos propios de las semillas. Estos son indicativos de precursores sensoriales como polifenoles, acidez volátil y alcaloides (De La Cruz Medina, 2012).

2.2.4. Secado

El secado de cacao es una actividad que se la debe realizar al momento de finalizar con la fermentación de los granos. Durante este proceso las semillas pierden humedad de 60% a entre 5% a 8% para así evitar la infección de moho durante el tiempo de almacenamiento (Prabhakaran Nair, 2010). Además, este proceso sirve para continuar cambios físicos que se iniciaron durante la fermentación. Al momento de realizar el secado de los granos de cacao fermentados, inicia reacciones de oxidación de polifenoles, obteniendo nuevos compuestos de sabor. Asimismo, en este proceso se da a pérdida de la membrana que recubre la semilla, evitando que los granos de cacao sean muy amargos y con mucha astringencia (Kongor et al., 2016).

Esta actividad se la realiza desde hace mucho tiempo atrás, en donde únicamente se secaban los granos de cacao extendiéndoles en el piso, generalmente alado de carreras, dejándoles durante varios días hasta que estos se encontraran secos. Esto dependía de factores climáticos como cantidad de sol o lluvia y la humedad relativa (De La Cruz Landero et al., 2015). Este método de secado a la vez de no ser eficiente trae varios problemas fitosanitarios, ya que estos granos se contaminan con smock, tierra, basura y otros contaminantes del ambiente. Por lo que en los últimos años se ha tratado de mejorar este proceso. Una de estas mejoras fue extender el cacao en patios de cemento bajo cubierta. alejado de carreteras para así evitar la

contaminación de los granos de cacao y disminuir el tiempo de secado (Saltini, Akkerman y Frosch, 2013).

Ya que el secado de los granos de cacao por estos métodos descritos anteriormente seguía siendo ineficientes, se creó nuevos métodos y es así como en los últimos años se desarrolló una técnica conocida como secado por convección artificial. Esta técnica consiste en introducir los granos fermentados en un secador, el cual está acondicionado para que el aire entre con temperatura y humedad controlada y los granos de cacao se sequen homogéneamente (Herman et al., 2018). Sin embargo, la aplicación de este método de secado requiere de una inversión significativa, la cual no poseen los pequeños y medianos productores y prefieren la utilización de métodos ineficientes en donde resulta granos de cacao secados heterogéneamente.

2.3. Bioquímica de la fermentación vs diversidad microbiológicas del cacao

2.3.1. Generación de compuestos bioquímicos (aromas y sabores).

La pulpa del cacao es un tejido parenquimático formado por células fusionadas derivadas del endocarpio y tegumento, cuya consistencia es babosa y de color blanco (mucílago) cuando se encuentra en etapa madura. Este tejido representa el 40% - 52% del peso fresco de la semilla madura (Biehl et al., 1989). Además, contiene en su mayoría agua (78% - 80%), azúcares simples (10% -15%), ácido cítrico (1-3%), proteínas ($\leq 1\%$), grasas ($\leq 0,5\%$), aminoácidos ($\leq 0,2\%$), entre otros (Schwan, 1998). A partir de la fermentación de la semilla estos componentes se transforman.

2.3.1.1. Compuestos aromáticos

Los compuestos aromáticos del cacao están comprendidos principalmente por polifenoles, flavonoides y taninos. Se encuentran presentes en plantas y frutos,

tienen propiedades funcionales como antiinflamatorios, antibacteriales, antioxidantes y anticancerígenos (Castro et al., 2016). Los polifenoles de la semilla se encuentran almacenados en células de los cotiledones. La cantidad total de estos compuestos solubles en semilla fresca varía entre 15 y 20%, pero las fermentadas se reducen hasta un 5%. No obstante, esto va a depender de la variedad y genotipo del cacao.

2.3.1.2. Azúcares

La pulpa del cacao al ser rica en carbohidratos, los azúcares presentes (glucosa, sacarosa y fructosa) intervienen directamente en el proceso de fermentación. La actividad microbiana sobre los azúcares de la pulpa conlleva a la producción de ácidos y reacciones exotérmicas, se condiciona indirectamente a la calidad organoléptica del cacao. No hay una mayor diferencia de composición de azúcares entre variedades (Jinap y Dimick, 1990).

2.3.1.3. Ácidos orgánicos (sabor y olor)

A partir de la fermentación del cacao, el embrión muere bajo la intervención de microorganismos y los ácidos orgánicos, los cuales reducen la concentración de oxígeno y la alta temperatura (≤ 50 °C). Los ácidos como el acético principalmente, reducen el pH del cotiledón, provocando la ruptura de sus membranas celulares. Esto permite el contacto entre sustancias almacenadas (proteínas, carbohidratos, polifenoles, triglicéridos etc.) y enzimas endógenas (Biehl et al., 1989).

2.3.2. Microbiología

Durante la fermentación intervienen una inmensa variedad de microorganismos del ambiente, ya que el cacao al momento de ser cosechado se encuentra semi estéril. Estos microorganismos desempeñan funciones específicas durante cada día de la fermentación (Rivera et al., 2012).

2.3.2.1. Levaduras

Las levaduras son hongos unicelulares, pertenecientes al Filo Ascomycota. Los términos como teleomorfo (estado reproductivo sexual, propio en un cuerpo que desarrolla fructificación) o anamorfo (estado reproductivo asexual) hacen referencia al estado reproductivo que se encuentra el hongo. Por lo tanto, algunos de estos microorganismos serán presentados en base a las características encontradas en la investigación (Kurtzman y Fell, 1998).

Las levaduras intervienen principalmente en los primeros días de la fermentación, su metabolismo es anaeróbico, en donde consumen el almidón y los azúcares que se encuentran en el mucilago del cacao y lo transforman en etanol y anhídrido carbónico. Asimismo, el ácido cítrico presente en los granos de cacao es consumido, lo que produce que disminuya el pH. Los géneros de levaduras que más se han reportado en la fermentación del cacao son: *Hansenula*, *Candida*, *Pichia*, *Kloeckra*, *Saccharomyces* y *Rhodotorula* (Nielsen, Jakobsen, y Jespersen, 2010).

2.3.2.2. Bacterias lácticas

Las bacterias lácticas o ácido lácticas intervienen en la segunda etapa de fermentación, las cuales consumen carbohidratos residuales y etanol disponible para la producción de ácido láctico. Por lo general esta fase se da al segundo y tercer día de la fermentación. Las bacterias más comunes en esta fase son del tipo *Lactobacillus* (*Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus collonides*), además se ha reportado bacterias como *Leuconostoc pseudomesenteroides* y *Leuconostoc pseudoficulneum* (Nielsen et al., 2007).

2.3.2.3. Bacterias Acéticas

En la tercera fase de la fermentación, aparecen las bacterias acéticas, las cuales llevan a cabo la transformación del etanol residual que produjeron las levaduras en ácido acético. Al momento de que se realiza esta transformación

de etanol a ácido acético se produce calor, ya que es una reacción exotérmica. Este ácido se difunde en el centro de los granos de cacao y juntamente con el alza de temperatura se produce la muerte del embrión de las semillas. Las bacterias acéticas que se han logrado identificar en esta etapa son: *Gluconobacter oxydans*, *Acetobacter acetii*, *Acetobacter pasteurianus* y *Acetobacter tropicalis* (Cleenwerck, Camu, y Engelbeen, 2008).

2.3.2.4. Bacterias esporuladas

Para finalizar la fermentación, en la cuarta etapa se desarrollan bacterias del género *Bacillus*. La alta temperatura favorece el desarrollo de este tipo de bacterias, las cuales producen numerosas enzimas que catalizan reacciones de productos que suelen ser los causantes de sabores y olores desagradables del cacao (Ardhana y Fleet, 2003).

2.3.2.5. Hongos esporulantes y filamentosos

Los granos de cacao son susceptibles a la contaminación por hongos en el proceso de fermentación. La microbiota creciente se ve afectada por los parámetros intrínsecos de los granos de cacao, como el pH, la actividad del agua y los diversos ácidos orgánicos producidos durante este proceso. Asimismo, son responsables de causar deterioro y alteración de las características organolépticas. La presencia de hongos filamentosos son motivo de preocupación debido a la posibilidad de formación de micotoxinas, como la aflatoxina y la ocratoxina A (Copetti et al.,2011). El rol de estos microorganismos en la fermentación del cacao no está comprendido a profundidad. Se conoce que algunas especies pueden causar hidrólisis en la pulpa y producir sabores que alteran las características organolépticas de los granos de cacao. El desarrollo extenso de hongos al final de la fermentación puede causar un mayor deterioro en la fase de secado (Ardhana y Fleet, 2003). Existen reportes de algunas especies como *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus tamarii*, *Aspergillus versicolor*, *Aspergillus carbonarius*, *Aspergillus niger*, *Penicillium sclerotiorum*, *Penicillium paneum*, *Penicillium crustosum*, *Mucor*

spp., *Rhizopus* spp., *Fusarium* spp. y *Trichoderma* spp.; la proliferación de especies toxigénicas que aparecen cuando el grano se encuentra dañado como *A. carbonarius*, *A. niger*, con el potencial de producir ocratoxina A y especies de *Fusarium* (Mounjouenpou et al., 2008).

3. CAPITULO III METODOLOGÍA

3.1. Zona de muestreo

Se realizó la toma de muestras de cacao Nacional y cacao Trinitario CCN-51 en la localidad de Vinces, provincia de Los Ríos, en la empresa COFINA – Republica del Cacao. Coordenadas: (-1.599635, -79.708337).



Figura 2. Ubicación de COFINA – República del Cacao

Tomada de: Google Maps, 2019

3.1.1. Toma y procesamiento de muestras de cacao

La fermentación de cacao en la variedad Nacional se realizó bajo techo en cajas de madera de (60 x 60 x 60 cm) con 150 kg de cacao en baba, en la

variedad Trinitario CCN-51 se realizó al aire libre en sacos de yute con 100 kg de cacao fresco. Se tomó muestras por duplicado de 500 gramos de los cuatro días de fermentación con tres repeticiones de cacao Nacional y cacao CCN-51. Las repeticiones se tomaron según la profundidad de la caja o saco donde se almacena el cacao en la etapa de fermentación, siendo repetición 1 el cacao que se encuentra en la parte superior y la repetición 3 el cacao que se encuentra en la base o parte inferior de la caja o saco. Para la toma de muestras se utilizó un barreno de PVC de 1,20 cm de largo y 10 cm de ancho y previamente desinfectado con alcohol 70%. Posteriormente las muestras de cacao fueron transferidas a bolsas plásticas estériles, etiquetadas y mantenidas en cadena de frío a $-80\pm 5^{\circ}\text{C}$ hasta el almacenamiento en el laboratorio para posterior análisis. Adicionalmente, datos de temperatura y de humedad ambiental circundantes a las áreas de muestreo fueron registrados (Lagunes Gálvez et al 2007).

Para la conservación y preparación de muestras, se pesó y se colocó en bandejas de aluminio 50 gramos de cacao de cada lote y repetición. El restante de la muestra se volvió a almacenar a -80°C . Se liofilizo las muestras en un liofilizador (Buchi Lyovapor L-200) durante 24 horas a temperatura de $-53,7^{\circ}\text{C}$ con un vacío de 0,34 hPa. Posteriormente, se retiró del liofilizador las muestras y se tomó el valor del peso seco de la muestra. Finalmente se homogeneizo con un molinillo manual para ser almacenado cada muestra en tubos falcón estériles de 50 ml. Estos tubos se almacenaron en ultracongelación a -80°C .

3.2. Análisis Químico

3.2.1. Determinación de pH

La medición de pH del cacao se la realizó basado en la metodología de Senanayake et al. (1997) con unas adaptaciones, en donde se partió de cacao liofilizado y molido, se pesó 1 g de cacao liofilizado y se añadió 10 ml de agua

MiliQ, se agito durante 10 minutos y se procedió a realizar las mediciones de pH utilizando un potenciómetro de líquidos.

3.2.2. Polifenoles totales

La determinación de las concentraciones de polifenoles totales en las diferentes muestras se realizó siguiendo la metodología descrita por Carrillo, Julián Londoño, Gil (2014). Previamente, se prepararon extractos con 2 g de cada muestra de cacao liofilizado en 40 ml de metanol al 80%. En vasos de precipitación se llevaron a agitación durante 1 hora en planchas de calentamiento. Posteriormente, se filtraron utilizando papel filtro y embudos de vidrio, obteniendo extractos sin residuos sólidos. Asimismo, se realizaron diluciones con los extractos 1:9 ml con agua MiliQ para bajar la concentración. Se tomaron 100 µl de cada dilución, se añadieron 500 µl del reactivo Folin Ciocalteu's, se incubaron a temperatura ambiente (20°C) las muestras durante 5 minutos y se añadieron 400 µl de solución de Carbonato de sodio. Posteriormente, se almacenaron en la oscuridad a temperatura ambiente durante 2 horas. Finalmente, se analizaron los resultados por cada variedad de cacao, por triplicado con 9 lecturas por cada día de fermentación (4). Se midió la absorbancia de las muestras a 760 nm contra un blanco que se elabora a con agua MiliQ en lugar de extracto metanólico de la muestra.

3.2.3. Ácidos orgánicos (ácido láctico, cítrico, málico y oxálico)

La determinación de las concentraciones de ácidos orgánicos en cacao se realizó siguiendo la metodología de Nour, Trandafir y Ionica (2010), la cual consistió en pesar 2,5 g de cada muestra de cacao liofilizado, estas mezcló con 30 ml de agua MiliQ cada una, se homogenizó en ultrasonido durante 10 minutos. Posteriormente, se colocó en una centrifugadora (*Eppendorf Centrifuge 5804R*) a 5000 rpm con temperatura de 5°C durante 30 minutos. Se extrajo el sobrenadante y se realizó dos lavados del sedimento con 10 ml de agua MiliQ y se centrifugó nuevamente durante 10 y 15 minutos respectivamente. Se mezcló los sobrenadantes y se homogenizó en

un vórtex (*Corning LSE*) durante 1 minuto. Finalmente, se filtró a través de membranas de 0,45 μm (*Millex GP*), se colocó en viales de vidrio y se llevó para análisis en HPLC (*high performance liquid chromatography*).

Para la fase móvil, se pesó 2,4 g de Fosfato diácido de Potasio (KH_2PO_4), se mezcló con 900 ml de agua MiliQ y se reguló el pH con un potenciómetro hasta pH 2. Posteriormente, se aforó a 1 L de agua MiliQ y se llevó al ultrasonido durante 15 minutos. La columna del HPLC es Eclipse Plus C18 5 μm 4,6 x 250 mm (*Agilent Technologies 1260 Infinity*).

3.2.4. Azúcares (glucosa, sacarosa y fructosa)

Las concentraciones de azúcares (sacarosa, fructosa y glucosa) se determinaron mediante HPLC siguiendo la metodología descrita por Dai et al. (2010), que consistió en: se pesaron muestras de cacao liofilizado por duplicado de 0,01 g y se traspasaron a balones aforados, en donde se los aforó a 100 ml con agua MiliQ y se homogenizó en un ultrasonido durante 10 minutos. Posteriormente 100 μl de las diferentes muestras se transfirieron a tubos Eppendorf y se añadieron 100 μl de NaOH 0,3 M, ajustando el pH hasta 13,5. A cada una de las muestras se añadieron 100 μl de solución de Poli Metil Piruvirato (PMP) 0,5 M y se incubó a 70°C durante 120 minutos en baño María. Las muestras se neutralizaron con 100 μl de HCl 0,3 M, se añadió 1 ml de cloroformo grado HPLC y se centrifugaron en una centrifugadora (Eppendorf Centrifuge 5424R) a 10000 rpm durante 5 minutos. Finalmente, de cada una de las muestras se extrajo el sobrenadante, se filtró a través de un filtro de 0.45 μm ; y cada filtrado se colocó en viales de vidrio (Agilent AG5182-0715) para el posterior análisis HPLC.

Para el análisis de las muestras a través de HPLC se realizó estándares para lo cual se pesó 10 mg de cada estándar comercial (sacarosa, fructosa y glucosa) y se los aforó a un volumen final de 10 ml. De estos estándares se tomaron diferentes alícuotas para realizar la curva de calibración. El rango utilizado para

la curva de calibración fue de 0,005 mg/ml a 0,070 mg/ml (5ppm a 70ppm). La columna de HPLC es Eclipse Plus C18 5 μ m 4,6 x 250 mm (*Agilent Technologies 1260 Infinity*).

3.3. Análisis Microbiológico

3.3.1. Dinámica poblacional

Para la determinación de la dinámica poblacional se mezcló asépticamente 20 g de cacao con 180 ml de solución buffer fosfato en una bolsa ziploc estéril y se agito manualmente durante 10 minutos para dar una suspensión uniforme. Se realizó diluciones consecutivas, las cuales fueron inoculadas en diferentes medios de cultivo. La cuantificación de levaduras se realizó en medio agar extracto de malta que contenía 50 mg/l de clora tetraciclina y 100 mg/l de cloranfenicol y con el medio NYDA (extracto de levadura 5 g L⁻¹, caldo nutritivo 8 g L⁻¹, agar 20 g L⁻¹ y dextrosa 10 g L⁻¹) que contenía 100 mg/L de cloranfenicol con incubación a 30° C durante 2 días. Las bacterias ácido lácticas se identificaron en agar *Man Rogosa Sharpe* (MRS) que contenía 100 mg/l de cicloheximida, el tiempo de incubación fue de 3 días a 30° C en anaerobiosis. Las bacterias ácido acéticas se identificaron en agar GYC que contenía 0,1% de ciclohexamida, se incubo durante 3 días a 30°C. Por último, los hongos filamentosos y esporulantes se identificaron en agar Rosa de Bengala con tiempo de incubación de 4 días a 25°C. Después de la incubación se determinó el recuento de los microorganismos, además se identificaron las especies de bacterias, levaduras y hongos por medio de observaciones morfológicas y pruebas bioquímicas (Ho et al., 2014a).

3.3.2. Identificación microbiota

Las levaduras se identificaron mediante la observación macro y microscópica de estructuras y colonias además de las propiedades fisiológicas descritas en por Kurtzman y Fell (1998).

Las bacterias se identificaron mediante pruebas macro y microscópicas, pruebas bioquímicas y fisiológicas descritas en el “Manual de Bacteriología de Bergey” (Krieg y Holt, 1984) . Adicionalmente se realizó pruebas bioquímicas Micro Gen A+B (*Microgen™ GN-ID Identification*) para bacterias ácido lácticas, acéticas y otras.

Para la identificación de hongos filamentosos y esporulantes se realizó observaciones macro y microscópica descritas por Agrios (2005).

3.4. Análisis estadístico

Para los datos de los análisis HPLC, espectrometría de ácidos orgánicos azúcares, polifenoles totales y parámetros fisicoquímicos se calcularon los promedios de 6 diferentes repeticiones en función del tiempo y para ambas variedades más la desviación estándar.

Los datos de la dinámica poblaciones de los diferentes microorganismos: levaduras, LAB, AAC y mesófilos fueron expresados en unidades formadoras de colonias por gramo (UFC/g de cacao seco), fueron transformados a logaritmo en base 10 para añadir homogeneidad a la varianza.

Para los datos de polifenoles totales se realizó en análisis de varianza y la separación de medias usando Student– *Newman–Keuls (SNK) test* ($p < 0.05$).

4. CAPITULO IV RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Parámetros bioquímicos

Como se observa en la Figura 3, que explica los cambios en la temperatura ambiental, los parámetros fisicoquímicos ambientales (temperatura y humedad relativa) e internos de la masa de cacao durante la fermentación en ambas variedades. Las fluctuaciones en la temperatura ambiental oscilaron entre de 17 °C a 34 °C para la variedad Nacional y entre 23 °C a 34°C para la variedad Trinitario CCN-51. Esto demuestra que para ambos procesos de fermentación la temperatura se mantuvo en rangos constantes; y que fluctuaciones se debieron a los cambios durante el día y la noche. Según los descrito por Lagunes-Gálvez (2014) estas fluctuaciones en la temperatura similares han sido reportadas para otras variedades de cacao ejemplo forastero durante la fermentación. Adicionalmente, se observaron ligeras diferencias entre la temperatura externa de la variedad Nacional respecto a la variedad CCN-51 que pueden explicarse por la mecánica del proceso de los resultados observados los cuales demuestran que no existe una variación significativa entre las variedades de cacao.

La humedad relativa en ambas variedades fue muy similar, esto debido a que los dos procesos de fermentación se realizan en la misma zona, el promedio de la humedad relativa del cacao Nacional fue de 82% mientras que del cacao CCN-51 fue de 85%. Respecto a los cambios en la temperatura interna, humedad y pH los resultados demuestran que al comienzo de la fermentación el contenido de humedad del grano de cacao de la variedad Nacional fue de 51,67% y el valor del pH fue $5,26 \pm 0,06$ (este fue considerablemente más alto que lo que generalmente se reporta el cual está en 3,6 en promedio). Se conoce que la acidez del grano de cacao depende sobre todo de la presencia de ácido cítrico (López y Passos, 1984). Al cabo de cuatro días, al finalizar la fermentación, el valor de pH disminuyó a $4,76 \pm 0.07$ y el contenido de humedad cayó a 48.81%. En cambio, el cacao CCN-51 presentó un valor de pH de $5,54 \pm 0,11$ y un contenido de humedad de 52,1%, después de los cuatro

días de fermentación el pH disminuyó hasta $4,74 \pm 0,4$ y la humedad cayó igualmente a 47,3%. Afoakwa et al. (2011), mostró que después del consumo de ácido cítrico y la producción de ácido acético, el valor de pH de los granos de cacao disminuye a 4,9. Durante la fermentación se evidenció el aumento de temperatura desde 26°C hasta 51°C en la variedad Nacional y de 22°C a 42°C en la variedad CCN-51 como se puede observar en las figuras 3 y 4. La diferencia de temperaturas de las 2 variedades se debe al método de fermentación y el lugar donde se realizó la fermentación. El cacao Nacional se fermentó en cajones de laurel y bajo techo, en donde la temperatura ambiental fue de $24^{\circ}\text{C} \pm 3$ en cambio el cacao CCN-51 se lo fermentó en sacos de yute, estos se encontraban al aire libre donde la temperatura ambiental estaba en $22^{\circ}\text{C} \pm 3$. Esta diferencia de temperatura influye en la calidad final de los granos de cacao como explica Schwan y Wheals (2004) ya que la temperatura optima que debe alcanzar el cacao con un buen grado de fermentación es de 45°C a 48°C.

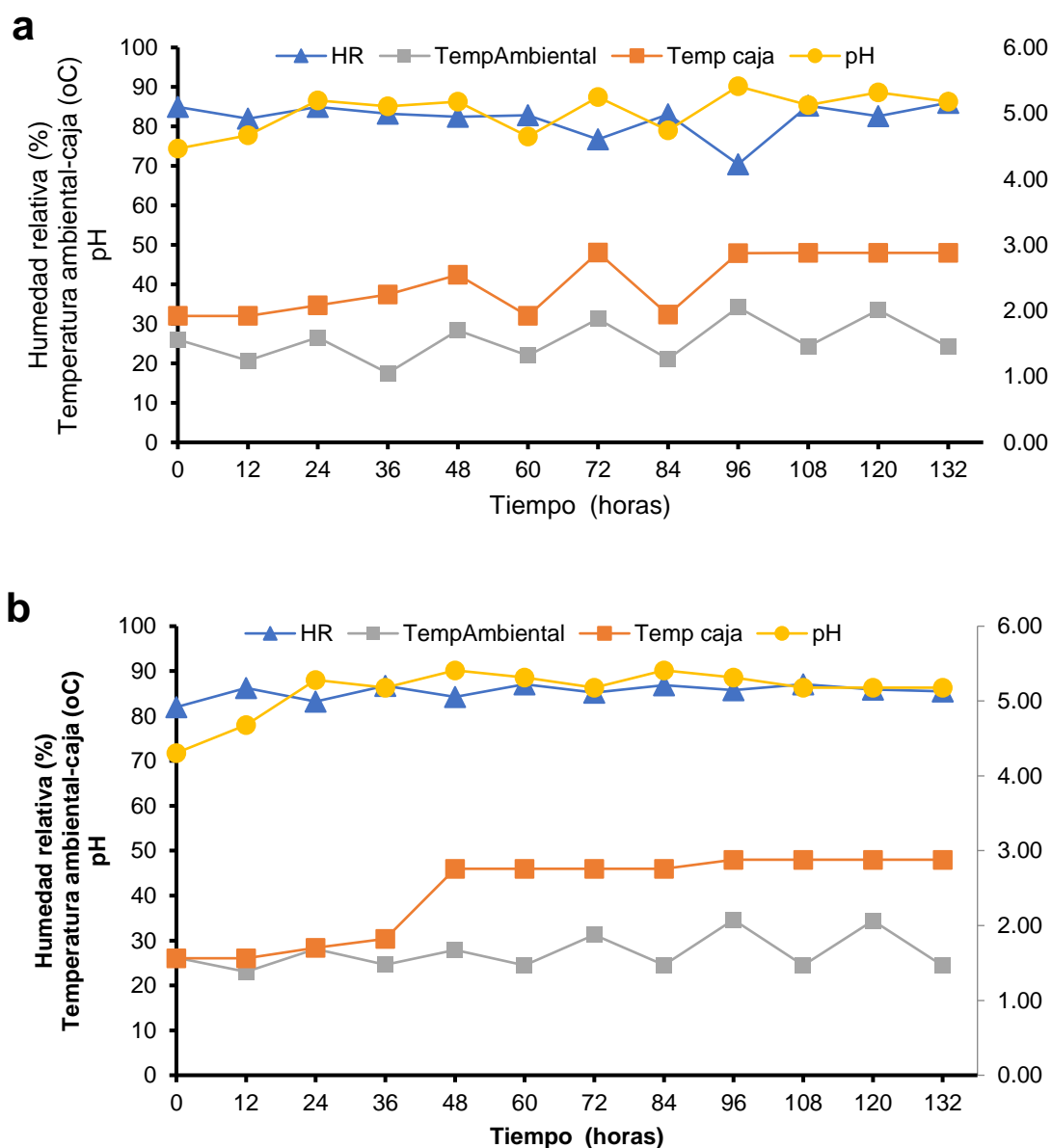


Figura 3. Variación de parámetros fisicoquímicos durante la fermentación de cacao variedades Nacional (a) y Trinitario CCN-51 (b). Cada línea representa el promedio de la temperatura ambiental (Temp-Amb), temperatura dentro de la caja (Temp-caja), humedad relativa (HR) y potencial hidrógeno (pH).

4.2. Ácidos Orgánicos

En la figura 4 se muestra los cambios en las concentraciones de ácidos orgánicos de cacao Nacional y cacao CCN-51 durante la fermentación. Las

concentraciones fueron calculadas con el peso seco y reportadas en mg/g de cacao seco.

En cacao Nacional (Figura 4a), en el primer día de la fermentación, el ácido cítrico es el más abundante con 10,37 mg/g seguido por el ácido oxálico con 4,55 mg/g, posteriormente se encuentra el ácido málico y ácido láctico con 1,39 mg/g y 1,38 mg/g respectivamente. En los posteriores días el ácido cítrico disminuye significativamente hasta alcanzar 4,71 mg/g al finalizar la fermentación. El ácido oxálico al segundo día disminuye significativamente, al tercer día vuelve a aumentar su concentración y por último al cuarto día disminuye a 3,80 mg/g. El ácido málico se mantiene constante en los 2 primeros días de fermentación, posteriormente tiene un aumento al tercer día y para finalizar la fermentación decrece a 1,91 mg/g. El ácido láctico durante los 4 días de fermentación aumenta su concentración significativamente hasta llegar a su pico más alto en el cuarto día con 14,46 mg/g.

En cacao Trinitario CCN-51 (Figura 4b), el ácido orgánico con más presencia en el día 1 de la fermentación es el ácido cítrico con 16,90 mg/g, seguido por el ácido oxálico con 4,61 mg/g, el ácido málico es el tercer ácido orgánico más abundante con 0,45 mg/g y el ácido láctico para este día de fermentación no se lo logró detectar. Durante los siguientes días de fermentación el ácido cítrico disminuye significativamente, en el segundo día alcanza su punto más bajo con 7,85 mg/g y vuelve a aumentar en el día 3 y 4 hasta llegar a una concentración de 14,49 mg/g. El ácido oxálico se mantiene constante durante los 4 días de fermentación y llega al último día con una concentración de 4,98 mg/g. La concentración de ácido málico aumenta durante los 4 días de fermentación hasta alcanzar 2,54 mg/g. Por último, la concentración de ácido láctico va aumentando paulatinamente y llega a su pico máximo al cuarto día con 4,17 mg/g.

Los ácidos cítrico, láctico y acético cumplen roles importantes en el desarrollo del chocolate (De Vuyst et al., 2010), además de impactos directos sobre la calidad de la semilla de cacao y pH del grano, lo que repercute indirectamente en la actividad de las enzimas del grano como las proteasas e invertasas que intervienen en la producción de aminoácidos libres, azúcares reductores y péptidos, que van a tener un impacto en el sabor del chocolate (Ho et al., 2014b). El ácido cítrico es el ácido que más cantidad se encontró en las 2 variedades de cacao analizadas, este es el responsable de proporcionar el valor de pH de los granos de cacao. Por lo general este ácido disminuye con el pasar de los días, esto debido al consumo de los microorganismos para una posterior transformación en ácido acético (Ardhana y Fleet, 2003). Aunque en el estudio realizado se determinó que el ácido cítrico disminuye al segundo día de la fermentación y al tercer y cuarto día este vuelve a aumentar en el cacao CCN-51. Esta fluctuación de ácido cítrico concuerda con la disminución de pH de los granos de cacao como se aprecia en la Figura 3b.

Las bacterias ácido lácticas son las responsables de consumir el alcohol disponible para posteriormente transformarlo en ácido láctico. Como se puede observar en la Figura 4, al primer día de la fermentación este ácido se encuentra en mínimas cantidades en la variedad Nacional y no se detecta en la variedad CCN-51, esto debido a que no se encontró ninguna bacteria láctica, al segundo día de la fermentación, hubo un incremento de dicho ácido en las 2 variedades de cacao, esto se produjo por la aparición de bacterias lácticas: *Lactobacillus fermenti* y *Lactobacillus delbrueckii* en cacao Nacional y *Lactobacillus fermenti*, *Lactobacillus casei* y *Lactobacillus delbrueckii* en cacao CCN-51, al tercer y cuarto día, estos microorganismos se mantienen presentes y se produce una cantidad mayor de ácido láctico. Comparando las dos variedades de cacao analizadas, en la variedad Nacional se encontró una mayor cantidad de ácido láctico que en la variedad CCN-51, esto debido a la

cantidad de bacterias lácticas que intervienen, esto se puede apreciar en la Figura 7.

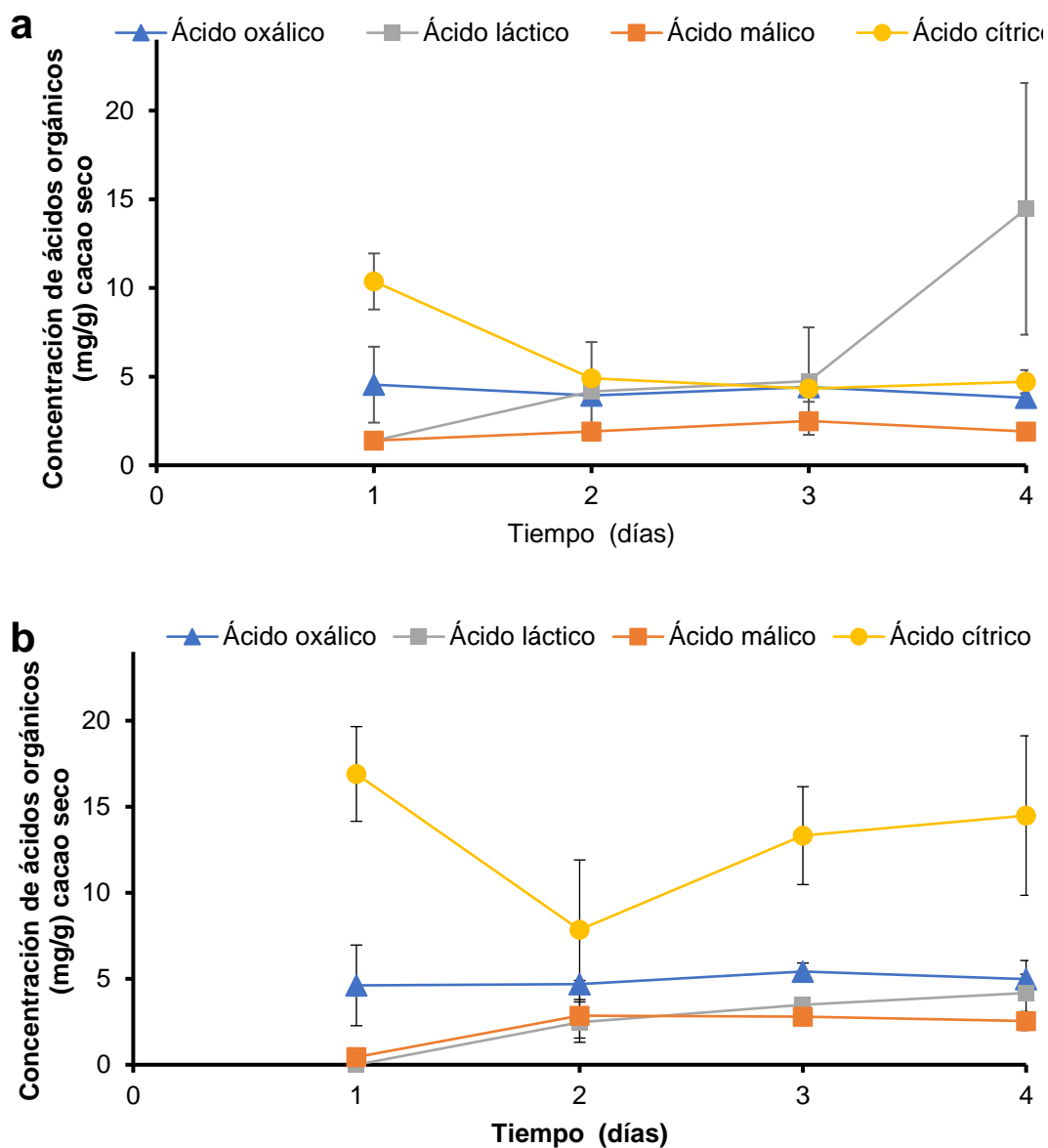


Figura 4. Variación de la concentración de ácidos orgánicos durante la fermentación de cacao variedades Nacional (a) y Trinitario CCN-51(b). Cada línea representa el promedio de tres repeticiones más SD.

4.3. Azúcares

En la Figura 5 se muestra los cambios en las concentraciones de azúcares de cacao Nacional y cacao CCN-51 durante la fermentación. Las concentraciones

fueron calculadas con el peso seco y estas fueron reportadas en mg/g de cacao seco.

Al primer día de la fermentación, la fructosa es el azúcar más abundante en el cacao Nacional (3,80 mg/g), mientras que la concentración de glucosa y sacarosa es de 0,47 mg/g y 1,24 mg/g respectivamente, al pasar los días de la fermentación la fructosa disminuye en el día 4 a 2,04 mg/g, la sacarosa para el día 4 aumenta ligeramente a 1,30 mg/g y la glucosa se reduce a indetectable en los días 3 y 4 (Figura 5a). En el cacao CCN-51, de igual manera, el azúcar con más presencia es la fructosa con 3,14 mg/g en el primer día, seguido de la sacarosa con 1,59 mg/g y por último la glucosa con 1,27 mg/g. En los posteriores días las concentraciones de estos azúcares van disminuyendo como se observa en la Figura 5b a excepción de la sacarosa donde en el tercer día de la fermentación este valor aumenta ligeramente de 1,32 mg/g en el segundo día a 1,49 mg/g.

Los azúcares presentes en el mucílago del cacao son los que proporcionan los sustratos que permiten la fermentación, en donde una serie de microorganismos consumen dichos azúcares y crean compuestos los cuales son considerados precursores de aromas y sabores. La fructosa fue el azúcar con mayor abundancia en todo el proceso de fermentación en las 2 variedades de cacao, seguido por la sacarosa. Estos resultados se asemejan a los reportados en estudios anteriores (Ho, Zhao, y Fleet, 2014b; Lagunes Gálvez et al., 2007). De acuerdo con los artículos reportados, la fructosa y glucosa son consumidos principalmente por levaduras en los primeros días de la fermentación, por lo que al tercer día en la variedad Nacional y cuarto día en la variedad CCN-51, estos azúcares disminuyeron significativamente, lo que sugiere que existió una fermentación alcohólica en los primeros 3 días. La concentración de sucralosa se mantuvo constante durante la etapa de fermentación, en donde existieron pequeñas fluctuaciones no significativas en

las 2 variedades de cacao. Este comportamiento de la sucralosa sugiere que las levaduras no consumieron este tipo de azúcar, el cual va a intervenir en la reacción de Maillard durante el tostado de los granos de cacao (Afoakwa et al., 2008) (Figura 5).

Al momento de comparar los azúcares totales de las 2 variedades de cacao analizados, se determinó que en el cacao Trinitario CCN-51 existe una mayor cantidad de estos, esto se podría deber a la cantidad de mucílago que tiene esta variedad a comparación del cacao Nacional. Es así como se logró observar que en el cacao CCN-51 existe una mayor presencia de levaduras en la etapa de fermentación a comparación del cacao Nacional como se puede apreciar en la Figura 5.

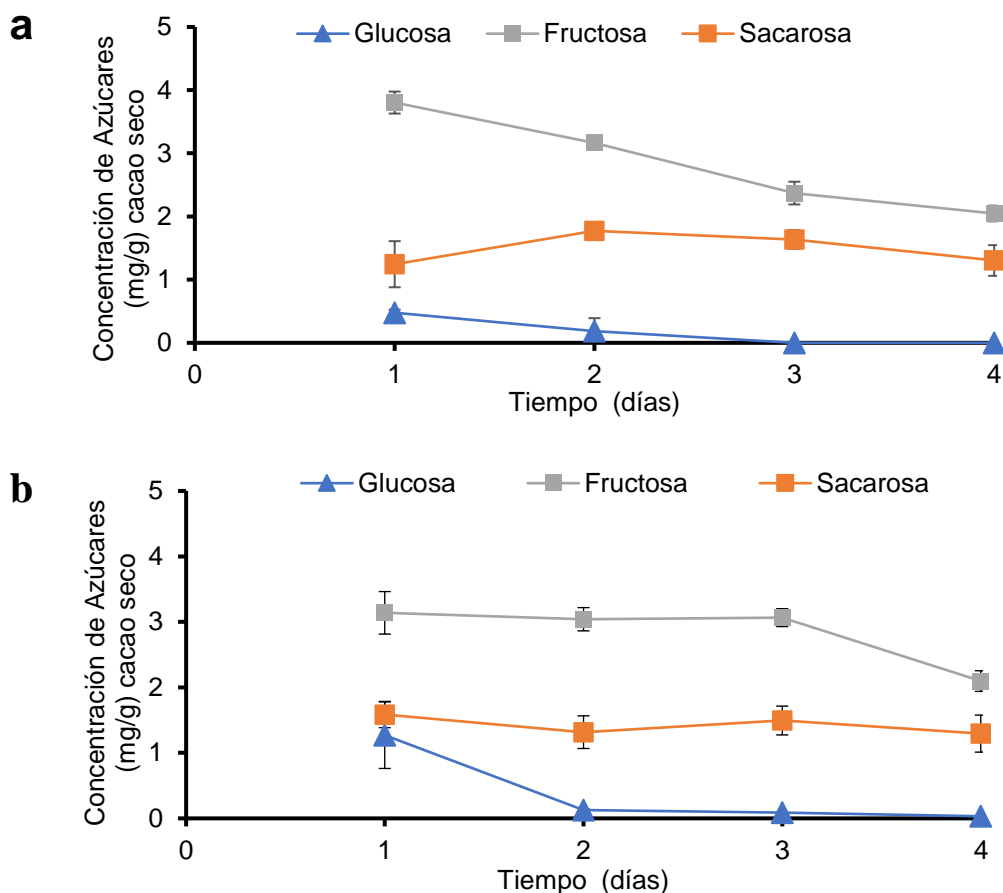


Figura 5. Variación de la concentración de azúcares durante la fermentación de cacao variedades Nacional (a) y Trinitario CCN-51(b). Cada línea representa el promedio de tres repeticiones más SD.

4.4. Polifenoles totales

El análisis de la fluctuación de las concentraciones de polifenoles en función del tiempo a lo largo del proceso de fermentación de cacao (Figura 6) muestra que para la variedad Nacional existe una similitud entre las concentraciones de polifenoles y no existe diferencias significativas entre los 4 días de fermentación.

En cambio, en la variedad de cacao Trinitario CCN-51 dentro de las primeras 48 horas las concentraciones se mantienen parecidas, posteriormente a esto la

concentración tiene un aumento significativo y al finalizar la fermentación disminuye la concentración. Las concentraciones de polifenoles se expresaron en mg GAE (ácido gálico) / g de cacao seco.

En la variedad Nacional la concentración de polifenoles totales de los extractos varió de $44,29 \pm 6,90$ en el primer día de la fermentación a $36,78 \pm 5,06$ en el último día, teniendo un pico máximo al segundo día de $46,52 \pm 0,29$; mientras que en la variedad CCN-51 la concentración de polifenoles totales varió de $42,31 \pm 2,33$ en el primer día de la fermentación a $41,87 \pm 7,80$ al cuarto día, llegando a tener un máximo de $54,00 \pm 3,77$ al tercer día. Comparando estas concentraciones con las reportadas por Carrillo et al (2014), las cuales están entre $44,94 \pm 1,17$ a $70,09 \pm 1,98$, se podría decir que la cantidad de compuestos fenólicos encontrados en las muestras que están fermentando son ligeramente menores a las que se encontraron en cacao donde ya finalizó el proceso de fermentación, las cuales se reportan en el artículo mencionado. Lo que sugiere que al momento de que el cacao se encuentra ya fermentado y seco, los compuestos fenólicos se concentran dentro de las semillas.

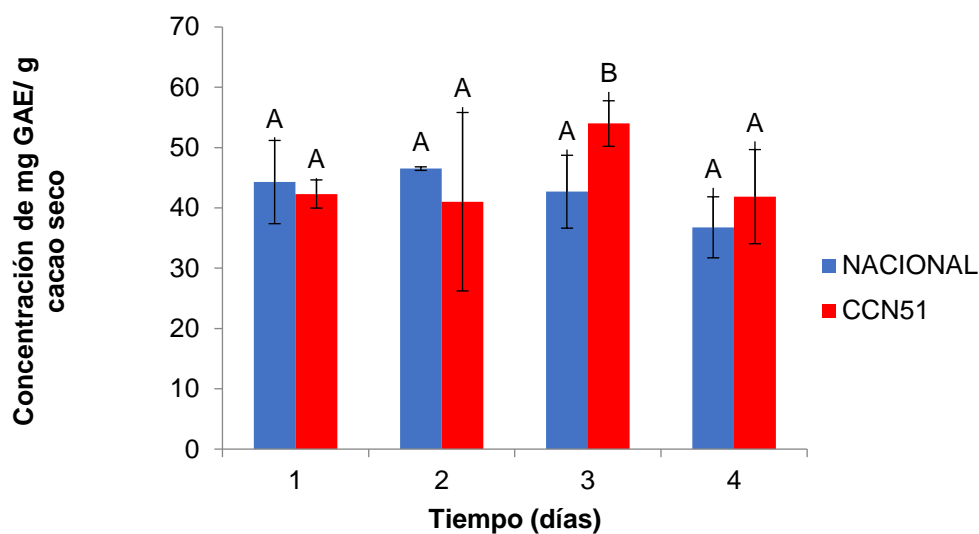


Figura 6. Variación de la concentración de polifenoles (g ácido gálico / g de cacao seco) totales durante la fermentación de cacao variedades Nacional y Trinitario CCN-51. Cada barra representa el promedio de tres repeticiones más SD. Las letras sobre cada barra representan diferencias significativas de acuerdo con test SNK ($P \leq 0.05$).

4.5. Dinámica Poblacional

La dinámica poblacional entre los microorganismos que forman parte o se encuentran presentes durante el proceso de fermentación son de importancia para el estudio. Esto se debe a que forman parte de los cambios de los compuestos presentes en los granos de cacao, cambiando sus características organolépticas. Es así que, se identificó una interacción en las dos variedades estudiadas entre los cuatro grupos de microorganismos que participan durante el proceso.

En un principio, se observó el crecimiento de microorganismos en cada caja Petri sembrada, según la variedad se determinó que existe una amplia diferencia en la concentración de microorganismos. De esta forma, la microbiota existente del cacao Nacional durante el primer y último día genera

una relación estable a comparación del cacao Trinitario CCN-51, que comenzó con una amplia diferencia en cuanto a la concentración de microorganismos. Estas diferencias se las puede apreciar en la Figura 7.

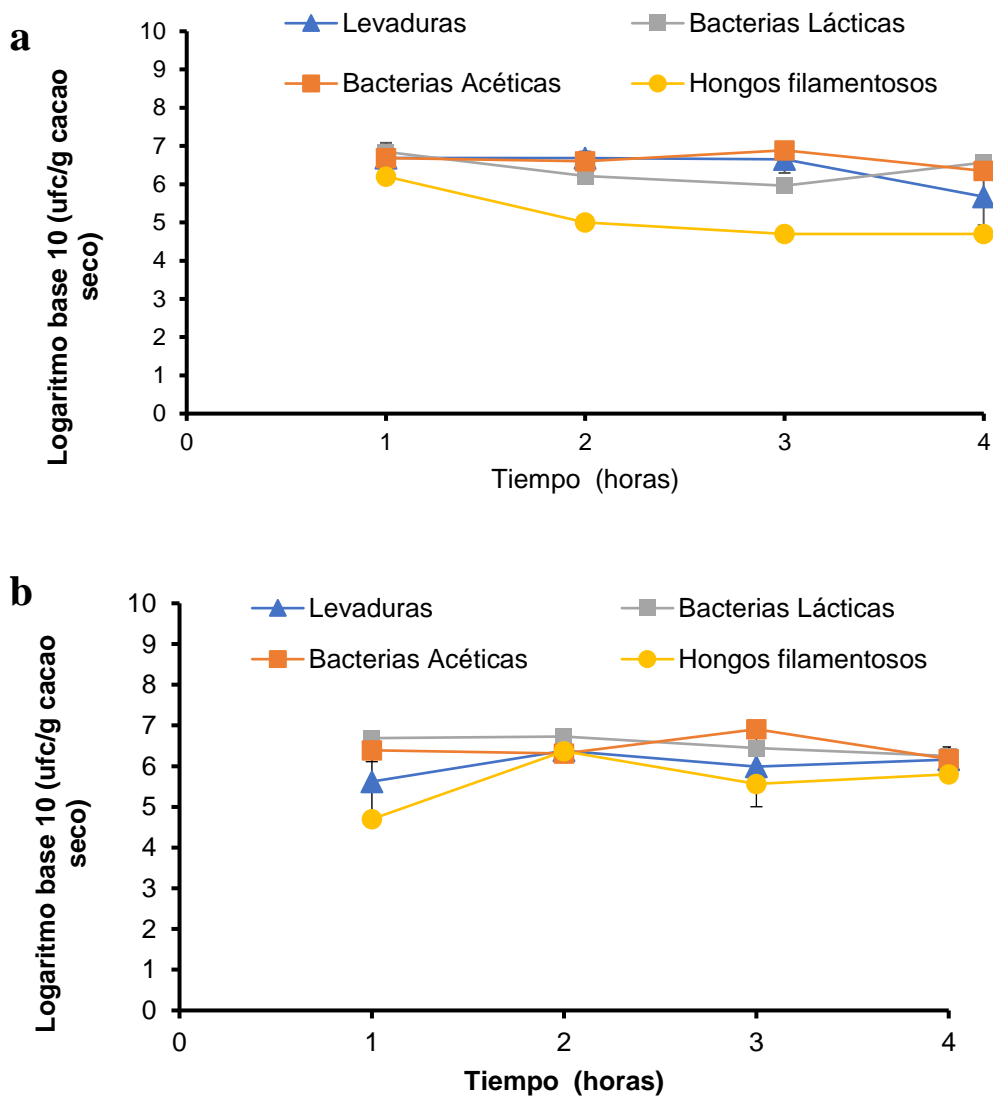


Figura 7. Crecimiento de levaduras, bacterias lácticas (LAB), bacterias acéticas (AAB) y hongos filamentosos durante la fermentación de cacao variedades Nacional (a) y Trinitario CCN-51(b). Cada línea representa el promedio de tres repeticiones.

4.6. Microorganismos

4.6.1. Levaduras

El resultado de la acción conjunta de los microorganismos en la fermentación del cacao data que la temperatura de la masa de semillas incrementa alrededor de 35°C -35 °C en las primeras 24 a 36 horas, por lo que empieza un proceso de muerte embrionaria, causando un incremento en su humedad y reduciendo el pH de la masa (Teneda, 2016). En la Figura 7, la concentración de levaduras en cacao Nacional en el primer día de la fermentación fue de 6,69 Log (UFC/g), para los días 2 y 3 la concentración se mantuvo constante con 6,68 Log (UFC/g) y 6,65 Log (UFC/g) respectivamente, para finalizar la fermentación en el día 4 la concentración disminuyó a 5,67 Log (UFC/g). En cambio, en la variedad Trinitario CCN-51 la concentración de levaduras no se mantuvo constante. Es así que, en el primer día de la fermentación la concentración estuvo en 5,62 Log (UFC/g), al segundo día la concentración aumentó a 6,38 Log (UFC/g), al tercer día disminuyó a 5,99 Log (UFC/g) y por último al cuarto día volvió a aumentar a 6,17 Log (UFC/g).

Los valores obtenidos reflejan que la concentración de levaduras en el cacao CCN-51 es mayor a la del Nacional, esto se debe a la cantidad de pulpa o mucílago presente en esta variedad y el sustrato en donde actúan estos microorganismos es mayor (Rubio, 2013). Asimismo, la acción de las levaduras en la pupa del cacao genera la síntesis de enzimas pectinolíticas, provocando un rompimiento en las paredes celulares de la masa. Esto permite la entrada de oxígeno necesario para la acción de bacterias lácticas y acéticas principalmente (Teneda, 2016). El desarrollo y crecimiento de levaduras implicadas en la fermentación del cacao, depende de varios factores como el tipo de cacao, el país proveniente, el nivel de madurez de la mazorca de cacao, la época del año, los factores climáticos y tratamientos en Poscosecha. Además, las especies resistentes serán las que se adapten mejor a estas

condiciones. Se evidencia que durante todo el proceso las levaduras son acompañadas por otros microorganismos.

Se aislaron 79 cepas de levaduras durante la fermentación, entre las cuales se identificaron morfológicamente los géneros y algunas especies de estos microorganismos (Tabla 2). Para la variedad Nacional fueron 41 tipos de cepas, y 38 para cacao Trinitario CCN-51, las cuales están comprendidas principalmente por *Candida* spp., *Haneispora* spp., *Pichia* spp., *Rhodotorula* spp. y *Saccharomyces* spp. En ambas variedades, las especies de levaduras identificadas, *Saccharomyces cerevisiae* y *Haneispora opotunitae*. fueron las más predominantes a lo largo del proceso la fermentación.

Estos resultados concuerdan con el estudio de Ardhana y Fleet (2003) realizado con muestras de cacao variedad Trinitario de Indonesia, se diferenciaron algunas especies de levaduras como *Candida tropicalis*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Kloeckera apis*, *C. pelliculosa*, *C. humicola*, *K. javanica*, *K. africana*, *Rhodotorula rubra*, *R. glutinis*. De igual forma, conforme el estudio de Papalexandratou y Vuyst (2011) en dos variedades de cacao (criollo y trinitario), de Malasia, Brasil, Ecuador, entre otros países, tuvo como resultado que los géneros de levaduras que tienen en común son *Hanseniaspora* spp., que fue la predominante en el estudio, seguidas por *Pichia* spp, *Saccharomyces* spp, *Candidas* spp., independientemente del origen del cacao.

Tabla 2.

Dinámica poblacional de levaduras en dos variedades de cacao Nacional y CCN-51

	NACIONAL				CCN-51			
	DIA 1	DIA 2	DIA 3	DIA 4	DIA 1	DIA 2	DIA 3	DIA 4
<i>Saccharomyces</i> spp. (<i>S. cerevisiae</i>)	*		*	*	*	*	*	*
<i>Hanseniaspora</i> spp. (<i>H. opuntiae</i>)	*	*		*		*	*	
<i>Candida</i> spp.	*	*			*	*		
<i>Rhodotorula</i> spp.	*	*				*	*	
<i>Pichia</i> spp.	*		*	*				

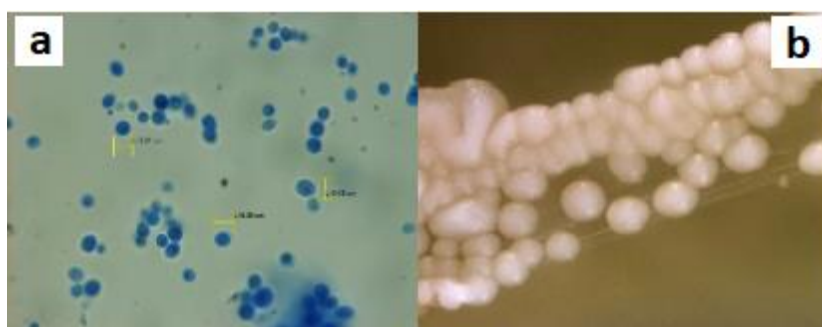


Figura 8. (a) Células globosas (100x) y (b) colonia (23x) de *Saccharomyces* spp.

En la figura 8 (a) se observa bajo microscopio con 100x a una especie de *Saccharomyces* spp, la cual presenta células grandes de forma globosa. En (b) se encuentra bajo al estereoscopio con 23x, la cual exhibe la colonia con forma circular, bordes uniformes, convexa y de color blanco.

Una de las levaduras predominantes en los resultados obtenidos del estudio es del género *Saccharomyces* spp. Se identificó a la especie *Saccharomyces cereviceae* (figura 8), la cual tuvo mayor presencia en las dos variedades de cacao Nacional y Trinitario CCN-51, debido a su rápido crecimiento durante las primeras 36 horas. Schwan (1998a) menciona que al final de la primera fase (entre las 36 horas a 38 horas) se presentan levaduras como *Saccaromyces*

cerevisiae, *Pichia membranaefaciens* y *Candida krusei*. De igual forma, Takrama et al. (2015) menciona que para la producción de jugo de pulpa fermentado de cacao, las levaduras principalmente *S. cerevisiae* y *Candida krusei*. Asimismo, Ardhana & Fleet, (2003) concuerda que *S. cerevisiae* es la especie de levadura que se detecta con mayor frecuencia y más abundancia y durante las fermentaciones de cacao en grano sin importar la variedad. Esto se debe a su rápido crecimiento, actividad pectonolítica, su rol en la producción y tolerancia al etanol.

Otro género importante en la fermentación del cacao es *Pichia spp*, esta se reporta en los resultados en cacao Nacional (Tabla 2). Esto se debe a que especies de este género, como *P. kudriavzevii* y *Pichia membranifaciens*, son de los principales productores de aromas en el cacao. En la especie *P. kudriavzevii* se ha reportado que es anamorfa de *Candida krusei* (Kurtzman, et al., 2011). Según investigaciones de Pereira et al., (2017) hechas en cacao Criollo y Forastero, se informó que es la especie de levadura más adaptada y relevante que participa en fermentaciones de granos de cacao de Ghana y Costa de Marfil. Este dominio al igual que en otros géneros se debe a su capacidad para soportar las condiciones estresantes (altas temperaturas y concentración de etanol) y su capacidad para metabolizar el ácido cítrico principalmente (De Vuyst et al., 2010). Asimismo, participa en los cambios en la composición de la pulpa que afectan la calidad del grano de cacao y del chocolate (Schwan, 2014).

En la figura 9 (a) se observa bajo microscopio con 100x a una especie de *Hanseniaspora spp.* (anamorfo de *Kloeckera spp.*), la cual presenta células de forma apiculada. En (b) se encuentra en vista al estereoscopio con 25,5x, la cual exhibe la colonia de forma circular, color blanco opaco y de borde ondulado.

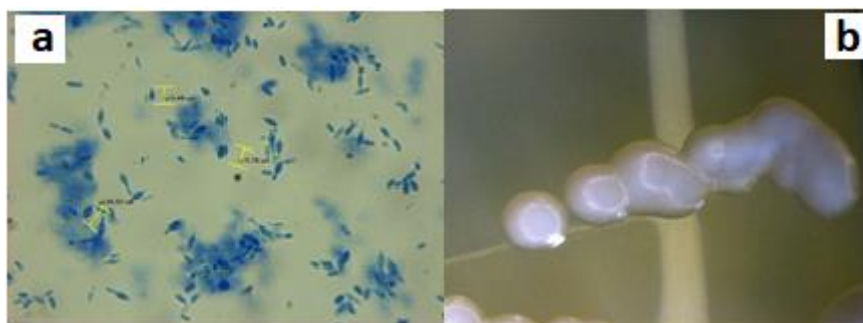


Figura 9. (a) Células apiculadas (100x) y (b) colonia (25,5x) de *Hanseniaspora* spp. (anamorfo de *Kloeckera* spp.)

Generalmente, después de una fase inicial de fermentación aparece frecuentemente la levadura *Hanseniaspora* spp. Esta clase de levadura se caracteriza por su fermentación controlada (Takrama et al., 2015). Asimismo, este microorganismo predomina durante los 3 a 4 días de fermentación en las dos variedades de cacao. En la Tabla 2 se observa que esta levadura en cacao Nacional tiene acción durante 4 días de fermentación, por lo que se presume que se habla de la especie *H. opuntiae*. Según Papalexandratou et al., (2013), los reportes realizados en Malasia con identificación genética, ha logrado diferenciar a *Hanseniaspora opuntiae* (anamorfo *Kloeckera* spp.) en cacao variedad Criollo en cajones de fermentación. Por otro lado, en la variedad Trinitario CCN-51 se presentó a partir del segundo y tercer día, relacionando a que su actividad fermentativa se inhibe por la acción del etanol generado por su metabolismo. Lo que ocasiona muerte celular debido al incremento de la concentración de subproductos como alcoholes, ácidos orgánicos, entre otros (Neus y Ochoa, 2002). Este género también tiene carácter fructofílico; actúa con otros microorganismos como *Lactobacillus fermentum* para la transformación de azúcares a glucosa (Escalante, 2011). Asimismo, como el género *Saccharomyces* spp. y *Pichia* spp (figura 9). son las más recurrentes en los procesos de fermentación de cacao, según Lefeber, et al. (2012) : Meersman et al. (2013) estos géneros son fermentadores importantes en el cacao y se consideran termo tolerantes al ser presente en condiciones ambientales y estrés químico por presencia de ácidos orgánicos y etanol.

En la figura 10 (a) se observa bajo microscopio con 100x a una especie de *Candida* spp., la cual presenta células grandes de forma elipsoidal. En (b) se encuentra en vista al estereoscopio con 17x, la cual exhibe la colonia con forma amorfa, con bordes blancos y centro rosa.

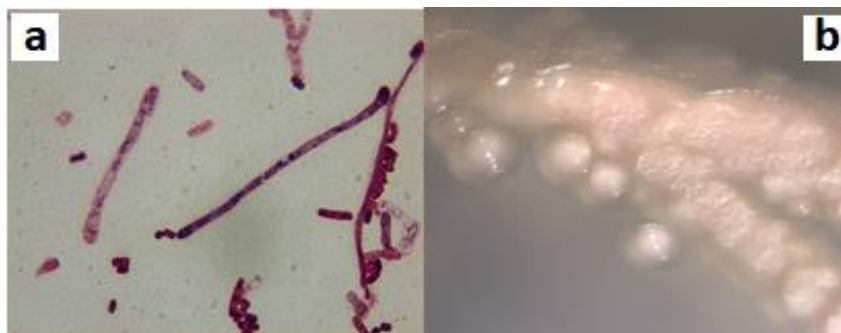


Figura 10. (a) Células alargadas (100x) y (b) colonia (17 x) de *Candida* spp.

Se identificaron especies de *Candidas* como *C. krusei* (Figura 10), *C. tropicalis* y *C. albicans*, las cuales según reportes han sido encontradas en material en descomposición; se caracterizan por su defenza ante el estrés químico y su adaptación a varios nichos ecológicos. Durante los dos primeros días en las dos variedades de cacao se encuentran presentes estos microorganismos. Según Camu et al. (2008), *Candida krusei* (anamorfo *Pichia kudriavzevii*), durante la fase temprana (24 horas a 48 horas) se encuentra directamente relacionado con la mayor producción de etanol por oxidación de azúcares. Ésta se encontró en fermentadores de cacao en Ghana; y es capaz de asimilar el citrato por un periodo de tiempo prolongado. Por otro lado, Ardhana y Fleet (2003) reportan la existencia de levaduras como *C. tropicalis* y *C. albicans*, que crecen a temperaturas y pH restrictivos, que para la mayoría de microorganismos no son tolerables. Asimismo, estas especies se las considera patógenas, aunque en el proceso fermentativo cumplen un rol importante en la primera etapa; y se ha reportado su crecimiento en temperaturas extremas $>50^{\circ}\text{C}$, como en cajones de fermentación de cacao. Estas han sido expuestas tras existir contaminación ambiental microbiana, que es causada por el material

variado entregado en el centro de acopio, las prácticas agrícolas empleadas y los implementos del medio donde se depositan los granos de cacao a fermentar (Fernández et al., 2016).

4.6.2. Bacterias

Tabla 3.

Dinámica poblacional de bacterias presentes en cacao Nacional y CCN-51.

	NACIONAL				CCN-51			
	DIA 1	DIA 2	DIA 3	DIA 4	DIA 1	DIA 2	DIA 3	DIA 4
<i>Lactobacillus fermenti</i>		*	*		*	*		*
<i>Lactobacillus casei</i>						*		*
<i>Lactobacillus delbrueckii</i>			*	*		*	*	
<i>Acetobacter aceti</i>	*	*	*					
<i>Staphylococcus spp.</i>					*			
<i>Micrococcus luteus</i>		*						
<i>Pseudomonas alcaligenes</i>					*			
<i>Pseudomonas cepacia</i>					*			

Nota: El * simboliza presencia

- **Bacterias ácido lácticas (LAB)**

La concentración de bacterias ácido lácticas en cacao Nacional (Figura 7a) no presentó variaciones significativas, al primer día de la fermentación la concentración fue de 6,85 Log (UFC/g), los posteriores días las concentraciones fueron similares hasta llegar al cuarto día en donde se encontraba en 6,57 Log (UFC/g). En la variedad CCN-51 las concentraciones

de bacterias lácticas (Figura 7b) en los 4 días de fermentación fueron casi iguales como se puede apreciar en la figura 7, en el primer día la concentración fue de 6,68 Log (UFC/g), al segundo y tercer día estuvo en 6,73 Log (UFC/g) y 6,44 Log (UFC/g) respectivamente, y por último en el cuarto día la concentración fue de 6,25 Log (UFC/g).

Las bacterias de esta clase fueron encontradas en medio MRS. Para estas se logró identificar según los resultados de las cepas aisladas (Tabla 3) a *Lactobacillus fermentum* (figura 13) en el cacao Nacional al segundo y tercer día y en el cacao Trinitario CCN-51 en el primero, segundo y cuarto día. De igual forma, *Lactobacillus casei* (figura 14) se encontró en cacao Nacional en tercer y cuarto día y en cacao T. CCN51 en segundo y cuarto día. Y a *Lactobacillus delbrueckii* en cacao Nacional día 3 y 4 y en cacao CCN51 en día 2 y 3. No obstante, Moreira et al. (2013); Nielsen et al. (2007) mencionan que *Lb. fermentum* y *L.plantarum* son las principales bacterias ácido lácticas que se presentan con frecuencia, debido a que consumen en las primeras etapas de la fermentación el citrato del cacao bajo condiciones de pH bajo, evitando así la competencia con las levaduras (citrato - negativas) que se encuentran degradando azúcares en condiciones anaeróbicas a etanol. Este proceso ha sido reportado en varios ensayos, como lo menciona Papalexandratou et al. (2013) se encuentra visible durante los primeros días de fermentación.

Asimismo, el aumento de la concentración de ácido láctico (Figura 7) condujo a la disminución de la acción enzimática de las levaduras. Según (Lagunes Gálvez et al., 2007) mediante varios ensayos, determinó que las bacterias ácido lácticas aisladas eran capaces de producir láctico, ácido acético, etanol y dióxido de carbono.

En la figura 11 (a) se muestra a pequeñas células de *Lactobacillus fermentum* vista al microscopio a 100x, las cuales son bacilos Gram positivo de forma alargada. En (b) se muestra la colonia viva bajo el estereoscopio a 3x, la cual es de forma circular, de color blanco y aspecto cremoso.

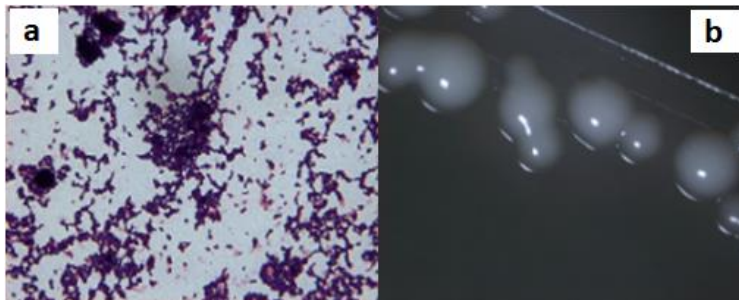


Figura 11. (a) Gram positivo (100x) y (b) colonia (3x) de *Lb. fermentum*

En la figura 12 (a) se muestra a pequeñas células de *Lb. casei* vista al microscopio a 100x, las cuales son bacilos Gram positivo de forma alargada. En (b) se muestra la colonia viva bajo el estereoscopio a 3x, la cual es de forma circular, de varios tamaños, de color blanco y aspecto cremoso.



Figura 12. (a) Gram positivo (100x) y (b) colonia (3x) de *Lactobacillus casei*

- **Bacterias ácido acéticas (AAB)**

Las bacterias acéticas están presentes en todo el proceso de fermentación, en la variedad Nacional la concentración de estas bacterias en el primer día fue de 6,67 Log (UFC/g), posteriormente se mantuvo constante las concentraciones por los siguientes días hasta llegar al cuarto día en donde se encontró en 6,35

Log (UFC/g). En el cacao CCN-51 igualmente las concentraciones fueron similares entre los 4 días, en donde en el primer día la concentración se encontró en 6,39 Log (UFC/g) y el último día se encontró en 6,17 Log (UFC/g) (Figura 7).

Las bacterias ácido acéticas se ubican en la familia Acetobacteraceae, son bacterias Gram-negativas, aerobias estrictas que no forman esporas (Krieg y Holt, 1984). Estas transforman el etanol que producen las levaduras en ácido acético, el cual es clave en la formación de precursores de sabor. El etanol y el ácido acético se esparcen al interior de los granos y, conjuntamente con las altas temperaturas, matan al embrión (Nielsen et al., 2007). De esta forma, las enzimas entran en contacto con los polifenoles y proteínas, por lo que inician reacciones hidrolíticas, produciendo cambios en la coloración del cotiledón. Las reacciones químicas pertinentes generan procesos exotérmicos. Posteriormente, el contenido de humedad disminuye y la escasez de agua produce la inactividad enzimática.

Las dos especies principales identificadas en la fermentación de los granos de cacao en las dos variedades estudiadas son *Acetobacter* spp. (figura 13) y *Gluconobacter* spp. (Figura 16), las cuales crecieron en medio NYDA y fueron caracterizadas según las pruebas de Microgen. Se logró identificar principalmente a *Acetobacter pasteurianus* y *Acetobacter aceti*, pues, son las que más predominan en el proceso. Es así que se determinó que sus parámetros óptimos de crecimiento son en Nacional 29°C-42°C y en CCN51 en 39-51°C, con pH. Por otro lado, Teneda (2017) indica que *Acetobacter* spp. es un tipo de bacteria que pertenece al género de Pseudomonas, son productoras de ácido acético, oxidan el etanol en ácido acético y transforman otros compuestos orgánicos en productos de oxidación diversos.

En la Figura 13, (a) se observan las células de *Acetobacter* spp. vista al microscopio a 100X, las cuales son bacilos Gram negativo. En (b) se encuentra la colonia vista bajo estereoscopio a 4x, la cual presenta forma circular, brillante, cremosa y color beige oscuro.

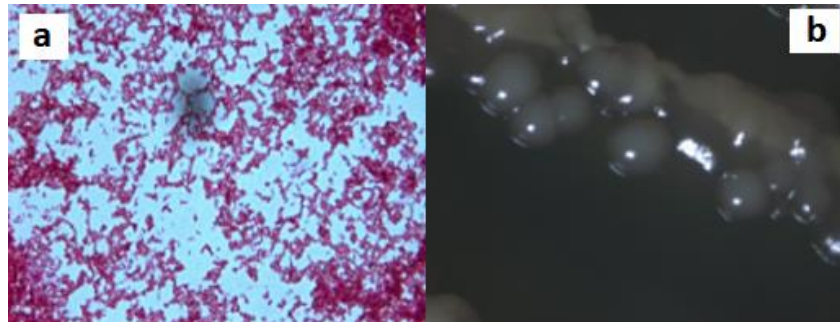


Figura 13. (a) Gram negativo (100x) y (b) colonia (4x) de *Acetobacter* spp.

En la Figura 14, (a) se observan las células de *Gluconobacter* spp. vista al microscopio a 100X, las cuales son bacilos Gram negativo. En (b) se encuentra la colonia vista bajo estereoscopio a 3x, la cual presenta forma circular, brillante, cremosa y color beige oscuro.

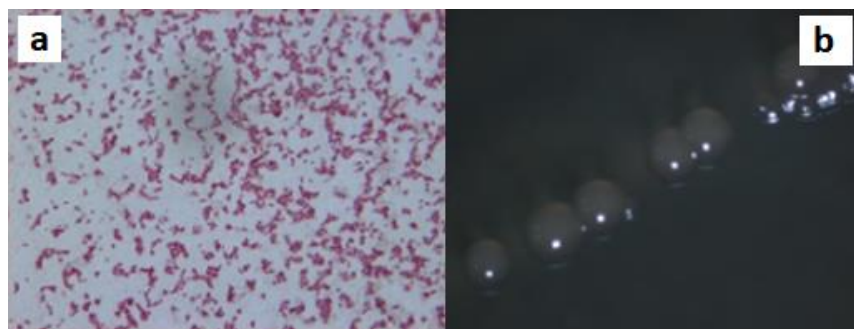


Figura 14. (a) Gram negativo (100x) y (b) colonia (3x) de *Gluconobacter* spp.

- **Otros microorganismos asociados al proceso de fermentación**

Las especies del género *Bacillus* spp. (figura 15) se consideran bacterias esporuladas por su presencia de esporas, se encuentran durante todo el proceso de fermentación a mayor nivel que las levaduras (Lima et al., 2011).

De igual, forma este género de bacteria crece durante las primeras horas del proceso de fermentación, no superan los 36°C y son responsables de producción de enzimas pectinolíticas (Ouattara et al., 2008). Además, señala que son capaces de producir dos tipos de enzimas pectinolíticas (pectina liasa y poligalacturonasa), al contrario de las levaduras que producen solo una enzima (poligalacturonasa). Zadi et al. (2018) mencionan que este género aumenta en medio ácido por la degradación de ácidos orgánicos (figura 4), características que determinan la obtención de granos de cacao de calidad. Por otro lado, la presencia de bacterias del género *Bacillus* spp. (figura 12) y *Pseudomonas fluorescens* en cacao CCN-51 determina que puede existir una acción anti fúngica para el control de las enfermedades del cacao (Zadi et al. , 2018).

En la figura 15 (a) se observa bajo microscopio con 100x a *Bacillus* spp., la cual presenta células pequeñas Gram positivo, alargadas con presencia de espora. En (b) se encuentra en vista al estereoscopio con 1,2x, la cual exhibe la colonia con forma amorfa, con bordes blancos y centro rosa.



Figura 15. (a) Gram positivo (100x) y (b) colonia (1,2x) de *Bacillus* spp.

En la Tabla 3, se puede observar que se identificaron especies de *Pseudomonas* como *P. cepacia* y *P. alcaligenes*. Estas aparecen únicamente en el primer día del cacao Trinitario CCN-51. Es un microorganismo endófito (propio de la planta, no patogénico), Gram negativo, de capacidad fermentante y productora de catalasas de amplia amplio espectro nutricional. Este género

también se ha reportado en investigaciones con cacao como biocontrolador conjuntamente con *Bacillus subtilis*. Además, se pueden considerar sidéforos (tipo antibiótico), pues, en pequeñas concentraciones pueden inhibir el crecimiento y otros procesos metabólicos de microorganismos (Falconí y Yáñez, 2007).

Se encontraron otro tipo de bacterias que no participan en el proceso de fermentación, pero si pueden estar presentes en el ambiente, ya sea por contaminación cruzada o manejo sin cuidado aséptico. Ejemplos claro de estos son: *Micrococcus luteus* (figura 16) y *Staphylococcus* spp (figura 17). Estos microorganismos se encuentran presentes en la mucosa y en la piel de los humanos y de otros mamíferos y aves. Se pudo determinar según la Figura 16 que *M. luteus* desaparece al segundo día en el cacao Nacional y en el CCN51 no tuvo presencia. De igual forma *Staphylococcus* spp. solamente se encuentra en el cacao CCN51 en el primer día. Existe investigaciones con *M. luteus* como potencial antagonista a *M. royeri* para control biológico (Suárez, s.f.).

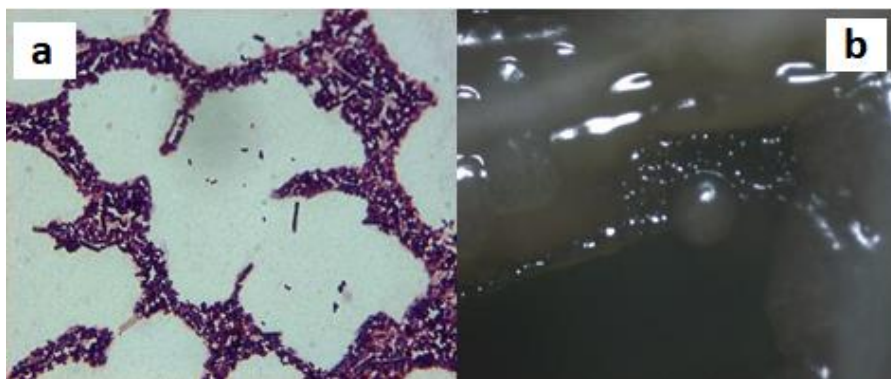


Figura 16. (a) Vista microscópica (100x) y (b) estereoscópica (x) *Micrococcus luteus*

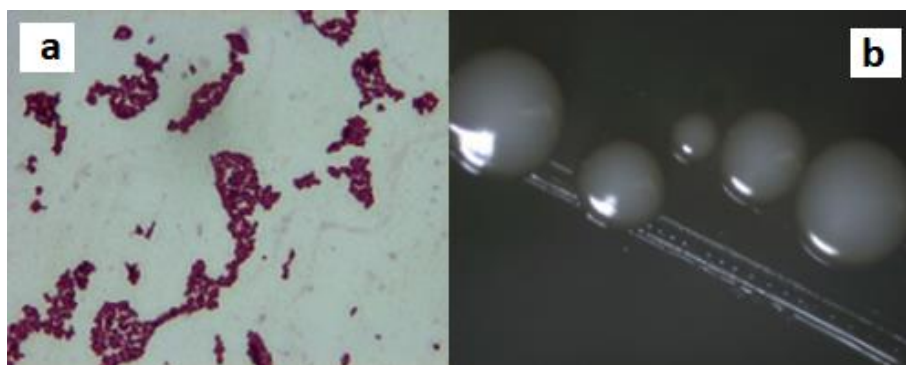


Figura 17. (a) Vista microscópica (100x) y (b) estereoscópica (x) *Staphylococcus* spp.

4.6.3. Hongos esporulantes y filamentosos

Tabla 4.

Dinámica poblacional de hongos esporulantes y filamentosos.

	NACIONAL				CCN-51			
	DIA 1	DIA 2	DIA 3	DIA 4	DIA 1	DIA 2	DIA 3	DIA 4
<i>Aspergillus fumigatus.</i>	*	*			*	*		
<i>Aspergillus versicolor</i>		*					*	
<i>Penicillium spp.</i>		*			*			*
<i>Geotrichum spp.</i>	*		*			*	*	
<i>Fusarium spp.</i>					*	*		
<i>Alternaria spp.</i>	*						*	

Los hongos esporulantes y filamentosos fueron los microorganismos que menos se encontraron durante la fermentación (Figura 7), en la variedad Nacional en el primer día se encontró 6,20 Log (UFC/g), posteriormente hubo un decrecimiento significativo en los días siguientes, es así como al segundo día se encontró 5 Log (UFC/g), al tercer y cuarto día la concentración fue la misma y fue de 4,69 Log (UFC/g). Mientras en cacao CCN-51 la concentración fue en aumento, al inicio de la fermentación se encontraba en 4,70 Log (UFC/g) y llegó al final de la fermentación con 5,79 Log (UFC/g).

En las variedades de cacao estudiadas, se encontró que a lo largo del proceso de fermentación existe la presencia de hongos esporulantes y filamentosos en todos los días de fermentación, esto se debe a la contaminación que existe tanto de los cajones de fermentación para el cacao Nacional, como las camas para el cacao Trinitario CCN-51. Schwan (1998b) menciona que un pequeño número de hongos filamentosos son capaces de producir enzimas hidrolíticas; pero en sí no participan dentro de la fermentación del cacao, aunque en las partes frías de la superficie de los cajones de fermentación se encuentran presentes.

Mediante la caracterización morfológica, se logró determinar varias especies de cepas, entre estas se encuentran las que son capaces de producir micotoxinas como *Aspergillus versicolor* y *Penicillium citrinum*. Asimismo, son capaces de producir enzimas pectinolíticas. La poligalacturonasa presenta una actividad pectolítica máxima a pH de 4.5 y temperatura de 50 °C. Se encontró, además, patógenos de plantas como *Alternaria* spp. y *Fusarium* spp. Estos microorganismos no son considerados parte del proceso de fermentación, debido a que no aportan beneficiosamente al grano de cacao. Asimismo, son indicadores de calidad.

En la Figura 18 (a) se encuentra el cuerpo fructífero de *Aspergillus fumigatus* visto superficialmente, de color verde oscuro. En (b) se observa las estructuras microscópicas del hongo.



Figura 18. (a) Características macroscópicas y (b) microscópicas de *Aspergillus fumigatus*.

En la Figura 19 (a) se encuentra el cuerpo fructífero de *Aspergillus versicolor* visto superficialmente, de color verde oscuro y borde blanco. En (b) se observa las estructuras microscópicas del hongo, con presencia de esporas.

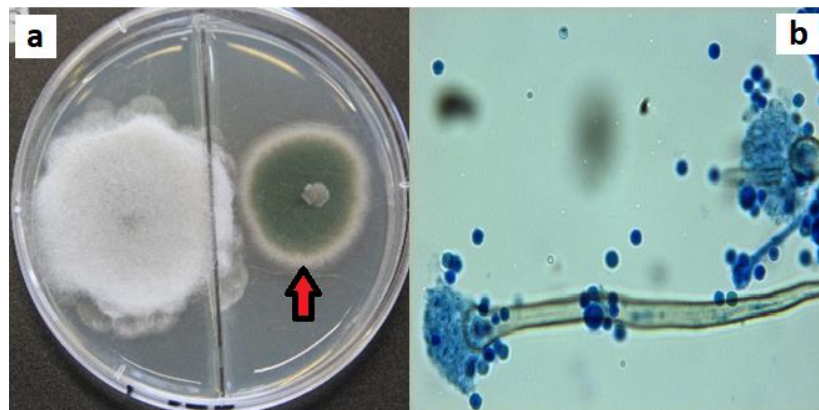


Figura 19 (a) Características macroscópicas y (b) microscópicas de *Aspergillus versicolor*

En la Figura 20 (a) se encuentra el cuerpo fructífero de *Fusarium* spp. visto superficialmente, de color blancas y. En (b) se observa las estructuras microscópicas del hongo.

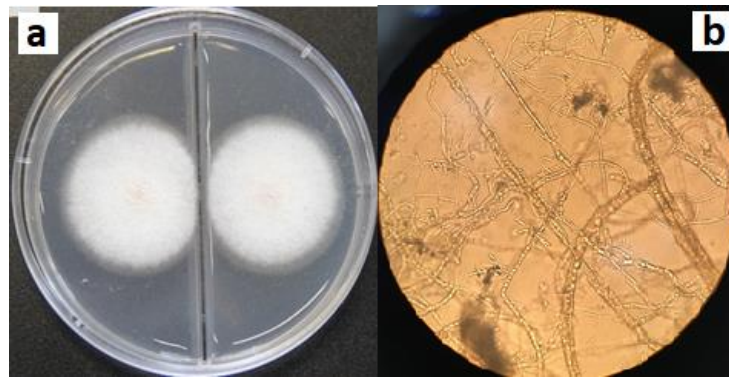


Figura 20 (a) Características macroscópicas y (b) microscópicas de *Fusarium* spp.

En la Figura 21 (a) se encuentra el cuerpo fructífero de *Penicillium* spp. visto superficialmente, de color blancas y cafés. En (b) se observa las estructuras microscópicas del hongo.

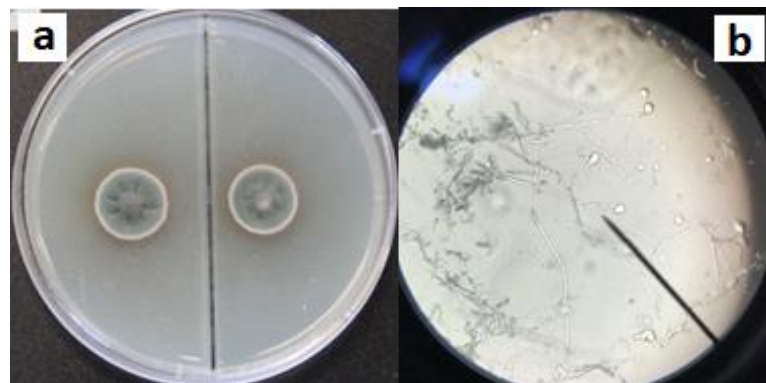


Figura 21 (a) Características macroscópicas y (b) microscópicas de *Penicillium* spp.

4.7. Análisis comparativos de dinámica poblacional, compuestos bioquímicos y factores circundantes durante el proceso de fermentación

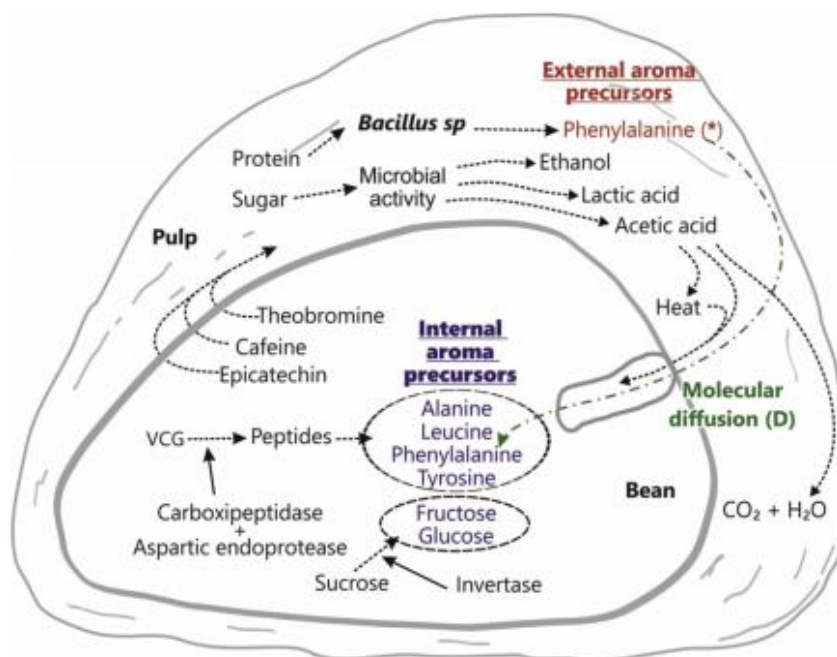


Figura 22 Transformación de compuestos bioquímicos en correlación con los microorganismos durante el proceso de fermentación.

Tomado de (Castro et al., 2019).

Como se muestra en la Figura 22, el proceso de fermentación comienza con una etapa inicial (24 horas a 48 horas) donde no contiene mayores cambios, una segunda etapa crítica (48 horas a 72 horas), donde los microorganismos dominantes participan. El cambio de temperatura se debe por los procesos exotérmicos que se van produciendo por la transformación de la materia circundante. Las levaduras pueden dividirse una vez cada dos horas, produciendo que sus enzimas descompongan la pulpa, esto produce ácido acético, matando al embrión del grano y esto transforma el amargor en aroma a chocolate. Estos microorganismos metabolizan a los azúcares de la pulpa, transformando la glucosa obtenida de la fructosa en ácido pirúvico. El cual es convertido con ayuda de las bacterias ácido lácticas, bajo condiciones anaeróbicas, en etanol. El proceso se repite con ligeras variaciones en cacao Nacional con respecto a Trinitario CCN-51, pues, depende principalmente de la variedad de cacao y el tratamiento que se someta el gran. En el Nacional los granos de cacao se los coloca directamente en los cajones de fermentación, a

diferencia del Trinitario CCN-51 que se coloca en toldas para que el mucílago chorree, lo que refiere a que la cantidad de metabolitos se encuentran en mayores concentraciones. En la Figura 4 se puede apreciar que en las dos variedades de cacao el ácido cítrico era el predominante. Como se sabe, las levaduras utilizan fuentes de carbono, el citrato se caracterizan por ser una sal del ácido cítrico y regulador de acidez por excelencia (de Melo Pereira et al., 2015).

Gracias al rompimiento de las paredes celulares del tegumento, el oxígeno puede ingresar. Esto genera el descenso en el pH interviniendo las bacterias ácido acéticas para convertir etanol obtenido en ácido acético. La temperatura ideal del proceso de fermentación acética está entre 28°C y 30°C y el pH óptimo es de 4,5. El etanol se oxida, convirtiéndolo en acetaldehído y posteriormente en ácido acético. Asimismo, se forman otros productos como ácidos orgánicos y acetato de etilo. Este fenómeno se puede apreciar (figura 3) en el cacao Nacional en el rango de temperaturas mencionados anteriormente. Por otro lado, en el cacao Trinitario CCN-51 los cambios de temperatura y pH no fueron tan significantes, la temperatura inicial se disparó durante las primeras 48 horas y posteriormente quedó estable. Estos cambios en el proceso muestran que existen fluctuaciones entre los compuestos bioquímicos presentes en las dos variedades de cacao, generando desprendimiento de energía. Según los estudios de Takrama et al. (2015) realizados en Ghana, la temperatura inicial de fermentación aumentó de 28.7°C a 34.9°C, después de 24 horas, disminuyó gradualmente hasta llegar a 29°C y posteriormente a las 60 horas volvió a incrementar. Según los resultados este mismo fenómeno ocurrió en la localidad estudiada.

Los microorganismos dependen de los procesos y metabolitos que se encuentren en el grano de cacao. Los que cumplen una función hidrolítica, participan en la oxidación de antocianinas y polifenoles y disminución de

astringencia. Por otro lado, los hongos, que son los principales indicadores de calidad para los granos de cacao fermentado.

5. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1. Conclusiones

Los resultados globales sobre la diversidad microbiana que influye el proceso de fermentación en las dos variedades de cacao Trinitario CCN-51 y Nacional; la generación compuestos orgánicos y las fluctuaciones en los parámetros circundantes demuestran que: Para ambas variedades de cacao existe una correlación directa entre los microorganismos identificados en las diferentes etapas de la fermentación y los compuestos bioquímicos cuantificados como azúcares y ácidos orgánicos. Con respecto a los polifenoles no se observó una codependencia entre las fluctuaciones de microorganismos y las concentraciones de estos compuestos.

Los resultados de los parámetros fisicoquímicos demostraron que la temperatura interna del proceso aumenta significativamente luego de las primeras 24 horas a 48 horas y que esta reacción exotérmica esta correlacionada con la actividad de levaduras pectinolíticas que transforman las fuentes de carbono a alcoholes principalmente etanol. Asimismo, las bacterias lácticas y acéticas transforman el alcohol en ácido láctico y acético respectivamente; estas son las responsables de la variación del pH en el proceso.

La caracterización morfológica de los diferentes microorganismos aislados se pudo determinar que las levaduras del género *Saccharomyces* spp., especialmente la *S. cerevisiae* en compañía con otras especies como *Hanseneispora oportunitae*, *Candida krusei* y *Pichia kudriavzevii* son las

especies que dominaron la fermentación. Seguidas por las Bacterias, las cuales fueron halladas varias especies que eran directa e indirectamente asociadas al proceso de fermentación. *Lactobacillus* y *Acetobacter* fueron las que dominaron en la producción de ácidos precursores de aroma y sabor. Asimismo, se detectó la presencia de bacterias esporuladas como *Bacillus* spp., el cual es muy buen indicador en contra de la acción de microorganismos patógenos. Por otro lado, los hongos presentes en todos los días de fermentación, se debe a que el área en donde se encontraban los granos de cacao de las dos variedades estaba contaminada, como *Aspergillus* y *Fusarium*.

5.2. Recomendaciones

Para futuros estudios se recomienda incorporar técnicas de biología molecular para la identificación de microorganismos aislados durante el proceso de fermentación del cacao.

El uso de inoculantes de microorganismos durante la fermentación del cacao podría generar una fermentación controlada, lo que mejoraría este proceso, obteniendo granos de cacao con mejores características organolépticas y con un valor mayor en el mercado local e internacional.

Se recomienda investigar más sobre la Poscosecha del cacao, desde la fermentación hasta el secado, para determinar compuestos bioquímicos y microorganismos que se encuentran presentes durante todos estos procesos de Poscosecha.

REFERENCIAS

- Acebo Plaza Mauro. (2016). Industrialización del cacao. Recuperado de <http://www.espae.espol.edu.ec/publicaciones-de-espae/>
- Afoakwa, E. O, Kongor, J. E., Takrama, J., & Budu, A. S. (2013). *Changes in nib acidification and biochemical composition during fermentation of pulp pre-conditioned cocoa (Theobroma cacao) beans. International Food Research Journal, 20(4), 1843–1853.* Recuperado de <https://pdfs.semanticscholar.org/8f7f/2de7f0f1bf2ed3c7af2ea8a75f4ef5d4c945.pdf>
- Afoakwa, Emmanuel Ohene, Paterson, A., Fowler, M., & Ryan, A. (2008). *Flavor formation and character in cocoa and chocolate: A critical review. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 48(9), 840–857.* <https://doi.org/10.1080/10408390701719272>
- Afoakwa, Emmanuel Ohene, Quao, J., Budu, A. S., Takrama, J., & Saalia, F. K. (2011a). *Effect of pulp preconditioning on acidification, proteolysis, sugars and free fatty acids concentration during fermentation of cocoa (Theobroma cacao) beans. International Journal of Food Sciences and Nutrition, 62(7), 755–764.* <https://doi.org/10.3109/09637486.2011.581224>
- Afoakwa, Emmanuel Ohene, Quao, J., Budu, A. S., Takrama, J., & Saalia, F. K. (2011b). *Effect of pulp preconditioning on acidification, proteolysis, sugars and free fatty acids concentration during fermentation of cocoa (Theobroma cacao) beans. International Journal of Food Sciences and Nutrition, 62(7), 755–764.* <https://doi.org/10.3109/09637486.2011.581224>
- Agell, O. (s/f). La seguridad alimentaria del chocolate. Recuperado de [http://www.inocua.org/site/archivos/investigaciones/la segur alimentaria chocolate.pdf](http://www.inocua.org/site/archivos/investigaciones/la_segur_alimentaria_chocolate.pdf)
- AGRIOS, G. N. (1952). *Plant pathology.* En *Plant Pathology* (Vol. 1). <https://doi.org/10.1111/j.1365-3059.1952.tb00010.x>
- Andrade, C. (2015). El cacao en el mundo. Recuperado el 23 de junio de 2019.

- ANECACAO. (2019). Estadísticas Actuales | Anecacao Ecuador. Recuperado el 11 de noviembre de 2019, de <http://www.anecacao.com/es/estadisticas/estadisticas-actuales.html>
- ANECACAO Ecuador. (2015). Historia del Cacao. Recuperado el 23 de junio de 2019, de <http://www.anecacao.com/es/quienes-somos/historia-del-cacao.html>
- Ángel, A. S. M., Diego, G. L., Steven, M. A., Tanya, D. L., & Paola, M. R. (2017). Manual Técnico del Cultivo de Cacao Buenas Prácticas para América Latina.
- Ardhana, M. M., & Fleet, G. H. (2003). *The microbial ecology of cocoa bean fermentations in Indonesia. International Journal of Food Microbiology.* [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(03\)00081-3](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(03)00081-3)
- Banco Central del Ecuador. (2016). Exportación de chocolates y derivados en 2015. Recuperado el 11 de noviembre de 2019, de <https://www.bce.fin.ec/>
- Barrientos Felipa, P. (2015). *the Cocoa Value Chain in Peru and Its Opportunities in the Global Market.* (37), 129–156.
- Batista, L. (2009). El Cultivo de Cacao. Recuperado de <http://www.cedaf.org.do>
- Biehl, B., Meyer, B., Crone, G., Pollmann, L., & Said, M. Bin. (1989). *Chemical and physical changes in the pulp during ripening and post-harvest storage of cocoa pods. Journal of the Science of Food and Agriculture*, Vol. 48, pp. 189–208. <https://doi.org/10.1002/jsfa.2740480207>
- Brunetto de Galignani, M. del R., Orozco Contreras, W., Delgado Cayama, Y., Clavijo Roa, S., Galignani de Bernardi, M., Ayala Montilla, C., & Zambrano García, A. (2014). Desarrollo de un método analítico para la determinación de glucosa, fructosa y sacarosa en muestras de cacaos criollos venezolanos. Recuperado de <http://scielo.sld.cu/pdf/ind/v26n3/ind03314.pdf>
- Cáceres, D. (2013). ¿Qué es el cacao y dónde se produce? Recuperado el 23 de junio de 2019.

- Campaña A.; Hidalgo F.; Sigcha A. (2017). Cacao y campesino: Experiencias de producción e investigación. Recuperado de https://www.avsf.org/public/posts/2117/cacao_campesinos_sipae_ecuador_2017.pdf
- Camu, N., De Winter, T., Addo, S. K., Takrama, J. S., Bernaert, H., & De Vuyst, L. (2008). *Fermentation of cocoa beans: influence of microbial activities and polyphenol concentrations on the flavour of chocolate*. *Journal of the Science of Food and Agriculture J Sci Food Agric*, 88, 2288–2297. <https://doi.org/10.1002/jsfa.3349>
- Caobisco. (2017). *Chocolate, biscuits & confectionery of Europe*. Recuperado el 11 de noviembre de 2019, de <http://caobisco.eu/caobisco-chocolate-biscuits-confectionery-europe-page-52-Facts-and-figures.html#.Xcow0DMzbIX>
- Carrillo, L. C., Londoño-Londoño, J., & Gil, A. (2014). *Comparison of polyphenol, methylxanthines and antioxidant activity in Theobroma cacao beans from different cocoa-growing areas in Colombia*. *Food Research International*, 60, 273–280. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2013.06.019>
- Castro-Alayo, E. M., Idrogo-Vásquez, G., Siche, R., & Cardenas-Toro, F. P. (2019). *Formation of aromatic compounds precursors during fermentation of Criollo and Forastero cocoa*. *Heliyon*, 5(1). <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2019.e01157>
- Cleenwerck, I., Camu, N., & Engelbeen, K. (2008). *Acetobacter fabarum sp . nov ., an acetic acid bacterium from a Ghanaian cocoa bean heap fermentation*. 2180–2185. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.65778-0>
- Copetti, M. V., Iamanaka, B. T., Frisvad, J. C., Pereira, J. L., & Taniwaki, M. H. (2011). *Mycobiota of cocoa: From farm to chocolate*. *Food Microbiology*, 28(8), 1499–1504. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2011.08.005>
- Cornejo, O. E., Yee, M.-C., Dominguez, V., Andrews, M., Sockell, A., Strandberg, E., ... Motamayor, J. C. (2018). *Population genomic analyses of the chocolate tree, Theobroma cacao L., provide insights into its*

- domestication process. Communications Biology*, 1(1).
<https://doi.org/10.1038/s42003-018-0168-6>
- Dai, J., Wu, Y., Chen, S., Zhu, S., Yin, H., Wang, M., & Tang, J. (2010). *Sugar compositional determination of polysaccharides from Dunaliella salina by modified RP-HPLC method of precolumn derivatization with. Carbohydrate Polymers*, 82(3), 629–635. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2010.05.029>
- De La Cruz Landero, E., Córdova Avalos, V., García López, E., Bucio Galindo, A., & Jaramillo Villanueva, J. L. (2015). Manejo agronómico y caracterización socioeconómica del cacao en comalcalco, tabasco. 17(1), 33–40. Recuperado de <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=49742125005>
- De La Cruz Medina, J., Vargas Ortiz, M. A., & Del Angel Coronel, O. A. (2012). CACAO: Operaciones Poscosecha. Recuperado de <http://www.fao.org/3/a-au995s.pdf>
- de Melo Pereira, G. V., Neto, E., Soccol, V. T., Medeiros, A. B. P., Woiciechowski, A. L., & Soccol, C. R. (2015). *Conducting starter culture-controlled fermentations of coffee beans during on-farm wet processing: Growth, metabolic analyses and sensorial effects. Food Research International*, 75, 348–356. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2015.06.027>
- De Vuyst, L., Lefeber, T., Papalexandratou, Z., & Camu, N. (2010). *The Functional Role of Lactic Acid Bacteria in Cocoa Bean Fermentation. Biotechnology of Lactic Acid Bacteria: Novel Applications*, 301–325. <https://doi.org/10.1002/9780813820866.ch17>
- del Rosario Castro, M., Hernández, J. A., Marcilla, S., Córdova, J. S., Solari, F. A., & Chire, G. C. (2016). *Effect of fat content in polyphenols concentration and antioxidant capacity of Theobroma cacao L."cacao". En Ciencia e Investigación (Vol. 19). Recuperado de http://repositorio.itp.gob.pe/bitstream/ITP/137/1/polifenoles_cacao.pdf*
- Falconí, C. E., & Yánez, V. del R. (2007). *Validación de biopesticidas para el control de la moniliasis y manejo sustentable del cacao fino y de aroma en el Ecuador (p. 83). p. 83. Recuperado de*

<http://repositorio.educacionsuperior.gob.ec/handle/28000/937>

- Fernández Maura, Y., Balzarini, T., Borges, P. C., Evrard, P., De Vuyst, L., & Daniel, H.-M. (2016). *The environmental and intrinsic yeast diversity of Cuban cocoa bean heap fermentations*. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2016.06.012>
- Ferrao, J. . (2008). A «morte da semente» sua importância na tecnologia pós-colheita do cacau. *Revista de Ciências Agrárias*, 262–268.
- Flores, L. A., Liliana, C., & Castellanos, N. (2009). Plan de Negocios Chocolatería Rincón del Chocolate Proyecto de Graduación Ingeniería Comercial.
- Freitas Schwan, R. (1998a). *The Microbiology of Cocoa Fermentation and its Role in Chocolate Quality Production of wines and vinegar from tropical fruits View project Traditional fermented foods and beverages View project*. <https://doi.org/10.1080/10408690490464104>
- Freitas Schwan, R. (1998b). *The Microbiology of Cocoa Fermentation and its Role in Chocolate Quality Production of wines and vinegar from tropical fruits View project Traditional fermented foods and beverages View project*. <https://doi.org/10.1080/10408690490464104>
- Herman, C., Spreutels, L., Turomzsa, N., Konagano, E. M., & Haut, B. (2018). *Convective drying of fermented Amazonian cocoa beans (Theobroma cacao var. Forasteiro). Experiments and mathematical modeling. Food and Bioproducts Processing*, 108, 81–94. <https://doi.org/10.1016/j.fbp.2018.01.002>
- Ho, V. T. T., Zhao, J., & Fleet, G. (2014a). *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>
- Ho, V. T. T., Zhao, J., & Fleet, G. (2014b). *Yeasts are essential for cocoa bean fermentation. International Journal of Food Microbiology*. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2013.12.014>

- ICCO. (2019). *Fine or Flavour Cocoa*. Recuperado el 7 de julio de 2019, de <https://www.icco.org/about-cocoa/fine-or-flavour-cocoa.html>
- INEC. (2019). Encuesta de Superficie y Producción- Agropecuaria- Continua (BBD) |. Recuperado el 10 de noviembre de 2019, de <https://www.ecuadorencifras.gob.ec/encuesta-de-superficie-y-produccion-agropecuaria-continua-bbd/>
- INIAP. (2011). Enfermedades Cacao – INIAP E.V.A. Recuperado el 5 de noviembre de 2019, de https://eva.iniap.gob.ec/web/wp-content/cache/page_enhanced/eva.iniap.gob.ec/web/cacao/enfermedades-cacao/_index.html
- INIAP. (2012). Cultivos de cacao tienen mayor producción con nueva semilla. Recuperado el 23 de noviembre de 2019.
- Jinap, S., & Dimick, P. S. (1990). *Analysis of non-volatile organic acids in fermented and dried cocoa beans by high performance liquid chromatography*. *Pertanika*, 13(1), 107–112.
- 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*, 82, 44–52. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2016.01.012>
- Krieg, N. R., & Holt, J. G. (1984). *Bergey's manual of systematic bacteriology, vol 1*. Recuperado el 4 de noviembre de 2019, de <https://www.worldcat.org/title/bergeys-manual-of-systematic-bacteriology/oclc/9042846>
- Kurtzman, C., & Fell, J. (1998). *The Yeasts (Fourth Edition)*. Elsevier Science.
- Kurtzman, C. P., Fell, J. W., Boekhout, T., & Robert, V. (2011). *Methods for isolation, phenotypic characterization and maintenance of yeasts*. En *The Yeasts* (Vol. 1). <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-52149-1.00007-0>
- Lagunes Gálvez, 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>
- Lefeber, T., Papalexandratou, Z., Gobert, W., Camu, N., & De Vuyst, L. (2012). *On-farm implementation of a starter culture for improved cocoa bean fermentation and its influence on the flavour of chocolates produced thereof. Food Microbiology*, 30(2), 379–392. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2011.12.021>
- Liliana Yanet Suárez Contreras¹ Alba Luz Rangel Riaño. (s/f). *pdf micrococcu*.
- Lima, Lí. J. R., Almeida, M. H., Rob Nout, M. J., & Zwietering, M. H. (2011). *Theobroma cacao L., “the food of the gods”: Quality determinants of commercial cocoa beans, with particular reference to the impact of fermentation. Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 51(8), 731–761. <https://doi.org/10.1080/10408391003799913>
- López, Monzón, R. (2016). Desarrollo de un modelo matemático para fermentación de cacao. Recuperado e 13 de septiembre de 2019.
- Lopez, A. S., & Passos, M. . (1984). *Factors influencing cacao bean acidity-fermentation, drying and the microflora*.
- MAGAP. (2015). II Parte Especialización productiva ecuatoriana: contrastes y diferencias territoriales según zonas de planificación y agendas de política por zona. Recuperado el 10 de noviembre de 2019, de www.agricultura.gob.ee
- MAGAP. (2018). Ecuador es el primer exportador de cacao en grano de América – Ministerio de Agricultura y Ganadería. Recuperado el 9 de noviembre de 2019, de <https://www.agricultura.gob.ec/ecuador-es-el-primer-exportador-de-cacao-en-grano-de-america/>
- Meersman, E., Steensels, J., Mathawan, M., Wittocx, P.-J., Saels, V., Struyf, N., ... Verstrepen, K. J. (2013). *Detailed Analysis of the Microbial Population in Malaysian Spontaneous Cocoa Pulp Fermentations Reveals a Core and Variable Microbiota. PLoS ONE*, 8(12), e81559.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0081559>

Miller, E. (2017). Diseño y establecimiento del cacao | Selección de sitios para la producción del cacao en un sistema agroforestal.

Moreira, I. M. da V., Miguel, M. G. da C. P., Duarte, W. F., Dias, D. R., & Schwan, R. F. (2013). *Microbial succession and the dynamics of metabolites and sugars during the fermentation of three different cocoa (Theobroma cacao L.) hybrids. Food Research International, 54(1), 9–17.* <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2013.06.001>

Mounjouenpou, P., Gueule, D., Fontana-Tachon, A., Guyot, B., Tondje, P. R., & Guiraud, J. P. (2008). *Filamentous fungi producing ochratoxin a during cocoa processing in Cameroon. International Journal of Food Microbiology, 121(2), 234–241.* <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2007.11.017>

Neus, M., & Jaimes Ochoa, E. (2002). Aspectos entomológicos relacionados con el dengue en el municipio José Félix Ribas, estado Aragua, Venezuela. *Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología.*

Nielsen, D. S., Teniola, O. D., Ban-Koffi, L., Owusu, M., Andersson, T. S., & Holzappel, W. H. (2007). *The microbiology of Ghanaian cocoa fermentations analysed using culture-dependent and culture-independent methods. International Journal of Food Microbiology.* <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2006.09.010>

Nielsen, Dennis S, Jakobsen, M., & Jespersen, L. (2010). *Candida halmiae sp . nov ., Geotrichum ghanense sp . nov . and Candida awuaili sp . nov ., isolated from Ghanaian cocoa fermentations. 1460–1465.* <https://doi.org/10.1099/ijs.0.016006-0>

Nour, V., Trandafir, I., & Ionica, M. E. (2010). *HPLC Organic Acid Analysis in Different Citrus Juices under Reversed Phase Conditions. 38(1), 44–48.*

Observatorio del Cacao. (2016). Origen y cultivo de la planta del cacao | Observatorio del Cacao.

Ololade, I., Ajayi, I. R., & Gbadamosi, A. (2010). *A Study on Effects of Soil*

Physico-Chemical Properties on Cocoa Production in Ondo State. Modern Applied Science, 4(5), 35. <https://doi.org/10.5539/mas.v4n5p35>

Ortiz de Bertorelli, L., Graziani de Fariñas, L., & Rovedas, G. (2009). *Agronomía tropical: revista del Instituto Nacional de Agricultura*. En *Agronomía Tropical* (Vol. 59). Recuperado de http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0002-192X2009000200001

Ouattara, H. G., Koffi, B. L., Karou, G. T., Sangaré, A., Niamke, S. L., & Diopoh, J. K. (2008). *Implication of Bacillus sp. in the production of pectinolytic enzymes during cocoa fermentation. World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 24(9), 1753–1760. <https://doi.org/10.1007/s11274-008-9683-9>

Ozturk, G., & Young, G. M. (2017). *Food Evolution: The Impact of Society and Science on the Fermentation of Cocoa Beans. Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 16(3), 431–455. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12264>

Papalexandratou, Z., Lefeber, T., Bahrim, B., Lee, O. S., Daniel, H.-M., & De Vuyst, L. (2013). *Hanseniaspora opuntiae, Saccharomyces cerevisiae, Lactobacillus fermentum, and Acetobacter pasteurianus predominate during well-performed Malaysian cocoa bean box fermentations, underlining the importance of these microbial species for a successful cocoa*. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2013.02.015>

Papalexandratou, Z., & Vuyst, L. (2011). *Assessment of the yeast species composition of cocoa bean fermentations in different cocoa-producing regions using denaturing gradient gel electrophoresis. FEMS Yeast Research*, 11(7), 564–574. <https://doi.org/10.1111/j.1567-1364.2011.00747.x>

Pereira, G. V. M., Alvarez, J. P., Neto, D. P. de C., Soccol, V. T., Tanobe, V. O. A., Rogez, H., Soccol, C. R. (2017). *Great intraspecies diversity of Pichia kudriavzevii in cocoa fermentation highlights the importance of yeast strain*

selection for flavor modulation of cocoa beans. Lwt, 84, 290–297.
<https://doi.org/10.1016/j.lwt.2017.05.073>

Pilar Eugenia Ramírez. (2013). El Cacao: ayer, hoy y siempre en el desarrollo socioeconómico y cultural del mundo, Norte de Santander y Cúcuta. *Revista MundoFesc, 2(6), 76–83.*

Portillo, E., Assemat, S., Davreieux, F., Boulanger, R., Graziani, L., & Cros, E. (2007). Formación del aroma del cacao criollo en función del tratamiento poscosecha. *9(1983), 458–468.* Recuperado de <http://www.cacao.fundacite.arg.gov.ve/congreso.php?doc=3>

Prabhakaran Nair, K. P. (2010). *The Agronomy and Economy of Important Tree Crops of the Developing World.*

PROEQUADOR. (2018). Cacao y elaborados – PRO ECUADOR. Recuperado el 4 de noviembre de 2019, de <https://www.proecuador.gob.ec/cacao-y-elaborados/>

Reddy, Y. M., & Andrade, H. (2010). *Assessment & Evaluation in Higher Education A review of rubric use in higher education A review of rubric use in higher education. Assessment & Evaluation in Higher Education, 35(4), 435–448.* <https://doi.org/10.1080/02602930902862859>

Rivera Fernández, R. D., Mecías Gallo, F. W., & Guzmán Cedeño, Á. M. (2012). Efecto del tipo y tiempo de fermentación en la calidad física y química del cacao (*Theobroma cacao l.*) tipo nacional. *Effect of time and type of fermentation in physical and chemical quality of cocoa (Theobroma cacao l.) national type. Ciencia y Tecnología., 5(1), 7–12.* <https://doi.org/10.18779/cyt.v5i1.165>

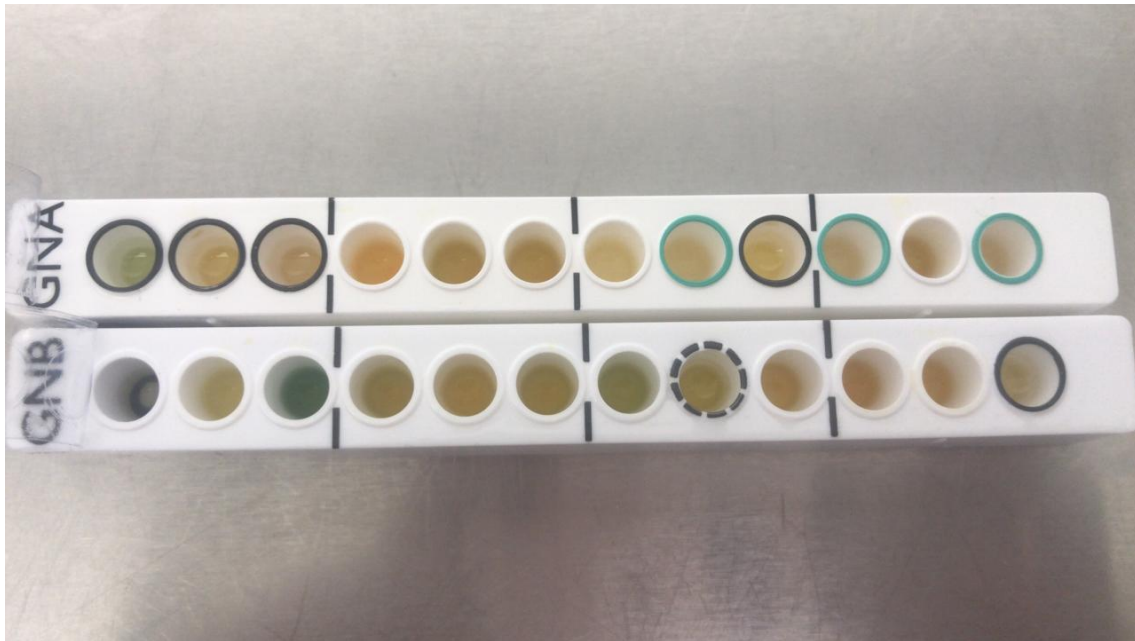
Rubio, J. E. J. (2013). Analizar y validar un programa de rehabilitación en la Poscosecha del Cacao CCN-51, en la Finca Rami, en la Provincia de los Rios. Recuperado de [http://www.dspace.espol.edu.ec/xmlui/bitstream/handle/123456789/25142/Tesis ESPOL2013 EDUARDO JORDÁN RUBIO.pdf?sequence=1&isAllowed=y](http://www.dspace.espol.edu.ec/xmlui/bitstream/handle/123456789/25142/Tesis_ESPOL2013_EDUARDO_JORDÁN_RUBIO.pdf?sequence=1&isAllowed=y)

- Saltini, R., Akkerman, R., & Frosch, S. (2013). *Optimizing chocolate production through traceability: A review of the influence of farming practices on cocoa bean quality*. *Food Control*, 29(1), 167–187. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2012.05.054>
- Schwan, R. F., & Wheals, A. E. (2004). *The microbiology of cocoa fermentation and its role in chocolate quality*. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 44(4), 205–221. <https://doi.org/10.1080/10408690490464104>
- Senanayake, M. (1997). *Effect of Different Mixing Intervals on the Fermentation of Cocoa Beans*. 50(Rohan 1963), 42–48.
- Soberanía, A. N., & Módulo, S. (2015). *LA FERMENTACIÓN DE ALIMENTOS*.
- Sukha, D. A., Butler, D. R., Umaharan, P., & Boulton, E. (2008). *The use of an optimised organoleptic assessment protocol to describe and quantify different flavour attributes of cocoa liquors made from Ghana and Trinitario beans*. *European Food Research and Technology*, 226(3), 405–413. <https://doi.org/10.1007/s00217-006-0551-2>
- Takrama, J. F., Kumi, W. O., Otoo, G., Addo, K., & Camu, N. (2015). *Optimization of cocoa pulp juice fermentation with yeast starter cultures of cocoa heap fermentations*. *Journal of Agricultural Science and Food Technology*, 1(3), 22–33.
- Teneda Llerena, W. F. (2017). *Mejoramiento del proceso de fermentación del cacao (Theobroma cacao L.)*. Recuperado de http://webcache.googleusercontent.com/search?q=cache:http://dspace.unia.es/bitstream/handle/10334/3743/2016_978-84-7993-319-7.pdf
- Teneda, W. (2016). *Mejoramiento del proceso de fermentación del cacao (Theobroma cacao L.) Variedad Nacional y Variedad CCN51*. Universidad Internacional de Andalucía, 1–140.
- Waldir Estela Escalante, Mojmír Rychteraa, Karel Melzocha, Beatriz Hatta Sakodab, Elena Quillama Poloc, Zulema Ludeña Cervantesd, Victor Sarmiento Casavilcad, G. C. Q. (2011). *Actividad fermentativa de*

Hanseniaspora uvarum y su importancia en la producción de bebidas fermentadas. Recuperado de http://ve.scielo.org/scielo.php?pid=S1315-25562011000100011&script=sci_arttext

- Zadi, A. L., Koua, G., Doue, G. G., & Niamke, S. L. (2018). *Investigation on Potential Starter of Bacillus spp. for Ivorian Cocoa Beans Fermentation Improvement. Turkish Journal of Agriculture - Food Science and Technology*, 6(12), 1758. <https://doi.org/10.24925/turjaf.v6i12.1758-1767.2078>
- Ziegleder, G. (1990). *Linalool contents as characteristic of some flavor grade cocoas. Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und -Forschung*, 191(4–5), 306–309. <https://doi.org/10.1007/BF01202432>

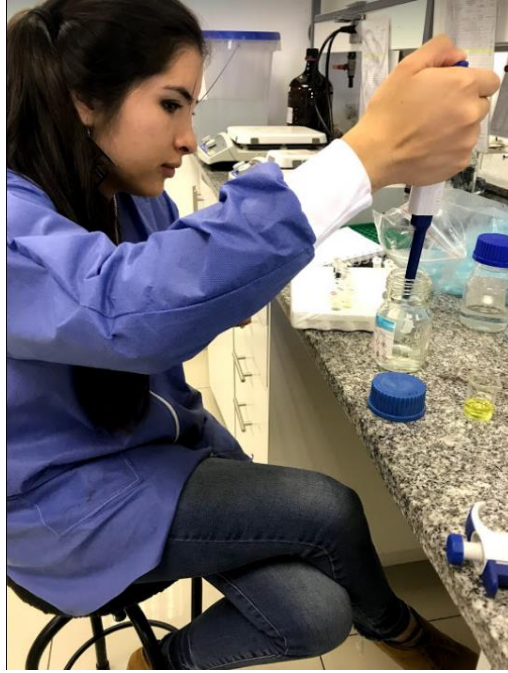
ANEXOS



Anexo 1. Pruebas de MicroGen para identificación de bacterias



Anexo 2. Reconocimiento y toma de muestra del cacao Trinitario CCN-51



Anexo 3. Preparación de muestras para análisis bioquímico

