



Universidad de Guayaquil

Facultad de Ingeniería Química

Carrera de Ingeniería Química

Proyecto de Titulación:

“Uso de Cultivos Iniciadores (Starter) en la Fermentación de Cacao Tipo Nacional Clon 103 y CCN51 en la Estación Pichilingue ubicada en Quevedo - Provincia de los Ríos”.

Nombre de las Alumnas:

Karen Stefania Llerena Arboleda

Zhayla Beatriz Uriña Gómez

Tutor:

Ing. Edgar Fernando Landines Vera

GUAYAQUIL – ECUADOR

2017

CERTIFICADO DE AUTORÍA

Yo, **KAREN SETFANIA LLERENA ARBOLEDA** con C.I. No. **0940957251** y **ZHAYLA BEATRIZ URIÑA GÓMEZ** con C.I. No. **0924286529** certificamos que los contenidos desarrollados en este trabajo de titulación, cuyo título es **“USO DE CULTIVOS INICIADORES (STARTER) EN LA FERMENTACIÓN DEL CACAO TIPO NACIONAL CLON 103 Y CCN51 EN LA ESTACIÓN PICHILINGUE UBICADA EN QUEVEDO PROVINCIA DE LOS RÍOS”** son de nuestra absoluta propiedad y responsabilidad Y SEGÚN EL Art. 114 del CÓDIGO ORGÁNICO DE LA ECONOMÍA SOCIAL DE LOS CONOCIMIENTOS, CREATIVIDAD E INNOVACIÓN*, autorizamos el uso de una licencia gratuita intransferible y no exclusiva para el uso no comercial de la presente obra con fines no académicos, en favor de la Universidad de Guayaquil, para que haga uso del mismo, como fuera pertinente.

Karen Stefania Llerena Arboleda
C.I. 0940957251

Zhayla Beatriz Uriña Gómez
C.I. 0924286529

*CÓDIGO ORGÁNICO DE LA ECONOMÍA SOCIAL DE LOS CONOCIMIENTOS, CREATIVIDAD E INNOVACIÓN (Registro Oficial n. 899 -

Dic./2016) Artículo 114.- De los titulares de derechos de obras creadas en las instituciones de educación superior y centros educativos.- En el caso de las obras creadas en centros educativos, universidades, escuelas politécnicas, institutos superiores técnicos, tecnológicos, pedagógicos, de artes y los conservatorios superiores, e institutos públicos de investigación como resultado de su actividad académica o de investigación tales como trabajos de titulación, proyectos de investigación o innovación, artículos académicos, u otros análogos, sin perjuicio de que pueda existir relación de dependencia, la titularidad de los derechos patrimoniales corresponderá a los autores. Sin embargo, el establecimiento tendrá una licencia gratuita, intransferible y no exclusiva para el uso no comercial de la obra con fines académicos.

AVAL DEL TUTOR

Yo **Ing. Edgar Fernando Landines Vera**, certifico haber tutelado el trabajo de titulación; **“Uso de cultivos iniciadores (Starter) en la fermentación de cacao tipo Nacional clon 103 y CCN51 en la Estación Pichilingue ubicada en Quevedo - Provincia de los Ríos”**, que ha sido desarrollado por **Karen Stefania Llerena Arboleda** y **Zhayla Beatriz Uriña Gómez**, previa obtención del título de Ingeniero Químico, de acuerdo al REGLAMENTO PARA LA ELABORACIÓN DE TRABAJO DE TITULACIÓN PARA EL GRADO DE TERCER NIVEL DE LA UNIVERSIDAD DE GUAYAQUIL, FACULTAD DE INGENIERÍA QUÍMICA.

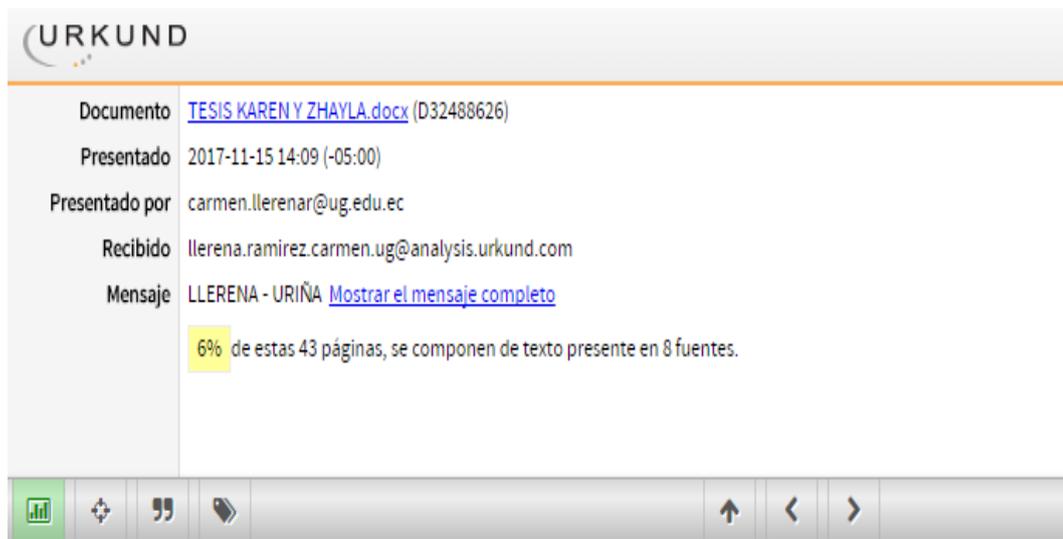
Atentamente.

Ing. Fernando Landines Vera

CERTIFICADO PORCENTAJE DE SIMILITUD

Habiendo sido nombrado **ING. FERNANDO LANDINES VERA, MSc**, tutor del trabajo de titulación, certifico que el presente trabajo de titulación ha sido elaborado por **KAREN STEFANIA LLERENA ARBOLEDA** con **C.C: 0940957251**, y **ZHAYLA BEATRIZ URIÑA GÓMEZ** con **C.C: 0924286529**, con mi respectiva supervisión como requerimiento parcial para la obtención del título de **INGENIERO QUÍMICO**.

Se informa que el trabajo de titulación: **“USO DE CULTIVOS INICIADORES (STARTER) EN LA FERMENTACIÓN DE CACAO TIPO NACIONAL CLON 103 Y CCN51 EN LA ESTACIÓN PICHILINGUE UBICADA EN QUEVEDO - PROVINCIA DE LOS RÍOS”**, ha sido orientado durante todo el periodo de ejecución en el programa antiplagio (URKUND) quedando el 6 % de coincidencia.



The screenshot displays the URKUND interface with the following information:

- Documento:** [TESIS KAREN Y ZHAYLA.docx](#) (D32488626)
- Presentado:** 2017-11-15 14:09 (-05:00)
- Presentado por:** carmen.llerenar@ug.edu.ec
- Recibido:** llerena.ramirez.carmen.ug@analysis.urkund.com
- Mensaje:** LLERENA - URIÑA [Mostrar el mensaje completo](#)

A yellow highlight indicates that **6%** de estas 43 páginas, se componen de texto presente en 8 fuentes.

The interface includes a toolbar at the bottom with icons for document analysis, search, and navigation.

Ing. Fernando Landines Vera
C.C 1205069824

DEDICATORIA

A DIOS.

Primeramente, por haberme dado la vida y permitirme haber concluido esta etapa de formación profesional tan importante para mí y por haberme dado fortaleza en los momentos difíciles durante este proyecto aprendiendo a valorarlos cada día más.

A MI MADRE ELENA.

Por demostrarme su cariño incondicional y ser el pilar más importante para mí, sin nunca faltar sus consejos llenos de optimismo siempre estuve ahí para apoyarme en todo momento.

A MI PADRE MARCELO.

A pesar de estar distanciados, sentí que siempre estuviste conmigo de alguna otra forma, sé que este momento es tan especial para ti como lo es para mí.

A MI HERMANO JONATHAN.

Que siempre ha estado junto a mí, ayudándome y brindándome su apoyo, quien me motiva a luchar por lo que quiero y desea que los cumpla muy pronto.

A MI GATO MERLÍN.

Por su tierna compañía en los constantes desvelos que tuve mientras escribía esta tesis.

KAREN STEFANIA LLERENA ARBOLEDA

AGRADECIMIENTO

Agradezco a Dios, por haberme bendecido durante toda esta etapa estudiantil y dado fuerzas para seguir luchando en los momentos más difíciles y superar cualquier obstáculo.

A mi madre, por el apoyo incondicional que me ha brindado siempre en todo el trayecto de mi vida, demostrándome su amor frente a cualquier caída y aconsejándome cada día para ser una excelente hija, hermana y desde ya una profesional.

A mi hermano, quien, con las innumerables conversaciones, aprendimos lo importante que es prepararse para la vida y por demostrarme que siempre podré contar con él.

Más que una hermana, a mi mejor amiga y compañera de tesis, quien está siempre ahí conmigo, en los buenos y malos momentos y por demostrarme lo valiosa que es esta amistad.

A mi enamorado Sergio, por haberme apoyado durante estos años de carrera, por su amor incondicional y compartir sus conocimientos conmigo, aprendiendo día a día a no rendirse fácilmente frente a las adversidades de la vida.

Al Ing. Carlos Molina, director del INIAP- Pichilingue, por habernos permitido la ejecución del proyecto ubicado en Quevedo, provincia de los Ríos.

Y totalmente agradecida a todos quienes me apoyaron para culminar este proyecto.

KAREN STEFANIA LLERENA ARBOLEDA

DEDICATORIA

A DIOS.

Por haberme dado la fuerza y convicción necesaria durante los años de la carrera, por ayudarme a no desfallecer bajo ninguna circunstancia por cuanto a las adversidades y por darme salud para de esta manera cumplir con los objetivos y metas establecidas desde el principio de la carrera.

A MI MADRE ALEXANDRA.

Por haberme dado un ejemplo de constancia, por brindarme su apoyo incondicional para que de esta manera pueda alcanzar la meta de tener una profesión dándole así mi gratificación eterna, por transmitirme cada día consejos, lecciones de vida los cuales ayudaron a no irme por el camino incorrecto e irme sin miedo y con paso firme por el camino correcto.

A MI PADRE EDSON.

Por haberme dado el ejemplo de constancia, perseverancia y a nunca desfallecer tras las adversidades que se puedan presentar en la vida tanto profesional como personal, por haber depositado en mí la confianza necesaria para que de esta manera pueda seguir adelante y cumplir con los objetivos y metas anhelados.

A MIS HERMANOS MILENA Y EDSON.

Por haber estado presente en esta etapa de mi vida y alegrarme con sus travesuras y ocurrencias los cuales que me han permitido dar un respiro al estar en una etapa tan ajetreada y sacrificada como lo es la educación superior.

ZHAYLA BEATRIZ URIÑA GOMEZ

AGRADECIMIENTO

Le agradezco a Dios ante todo por haberme dado salud y fuerzas para seguir un camino tan difícil como llegar a ser una profesional y a nunca abandonar mis ideales.

A mis padres Edson y Alexandra por apoyarme y haberme ayudado a culminar con éxitos mi vida escolar, de bachillerato y ahora mi vida profesional ayudándome de todas las formas posible a cumplir este sueño tan anhelado de poseer una profesión la cual es de ser Ingeniera Química.

A mi mejor amiga Karen que me ha acompañado en este camino difícil pero no imposible de andar, teniendo así noches en velas, madrugadas de estudio y por supuesto momentos muy amenos de charlas interminables.

A mi tutor el Ing. Fernando Landines por haberme dado el apoyo técnico, profesional y científico que me ha permitido culminar con éxito el presente proyecto de titulación.

Al Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuario Pichilingue (INIAP) por haberme brindado la ayuda necesaria e incondicional al haberme dado apertura a cualquier área de dicha estación para los estudios y análisis que requería la presente el presente proyecto de titulación.

A la Ingeniera Sofía Peña Herrera encargada del área de Fitopatología de la estación INIAP – QUEVEDO por ayudarme incondicionalmente en todo lo necesario a nivel personal y profesional, por haberme dado consejos e información técnica y científica útil para la culminación del presente proyecto de investigación.

Al Ingeniero Ignacio Sotomayor encargado del área de Post – Cosecha de la estación INIAP – QUEVEDO por la ayuda brindada sin interés alguno, durante el periodo que estuve en el centro de investigaciones.

ZHAYLA BEATRIZ URIÑA GOMEZ

Índice

CERTIFICADO DE AUTORÍA	i
AVAL DEL TUTOR.....	ii
CERTIFICADO PORCENTAJE DE SIMILITUD	iii
DEDICATORIA	iv
AGRADECIMIENTO	v
Índice de Cuadros	xi
Índice de Tablas	xii
Índice de Gráficos	xv
Índice de Fotografías	xvi
Resumen	xvii
Abstract	xviii
INTRODUCCIÓN	1
CAPÍTULO I: EL PROBLEMA	2
1.1 Planteamiento del problema	2
1.2 Diagnóstico del problema.....	3
1.3 Objetivos	4
1.3.1 Objetivo general	4
1.3.2 Objetivos específicos.....	4
1.4 Justificación e importancia	4
1.5 Hipótesis	5
CAPÍTULO II: REVISIÓN DE LITERATURA	6
2.1 Historia del cacao	6
2.2 Producción de cacao actual en el Ecuador	7
2.3 Variedades de cacao	8
2.4 Requerimientos agroclimáticos	10
2.5 Manejo post-cosecha del cacao.....	11
2.5.1 Cosecha y recolección	11
2.5.2. Desgrane	11
2.5.3. Fermentación	12
2.5.3.1 Proceso de fermentación de cacao.....	12
2.5.3.2 Métodos de fermentación	14

2.5.4 Secado	15
2.5.5 Selección y clasificación.....	15
2.5.6 Empaque y almacenamiento	16
2.6 Calidad del cacao	17
2.6.1 Calidad física de las almendras de cacao.....	17
2.6.2 Composición química de las almendras de cacao.....	18
2.6.3 Características de la pulpa como sustrato para la fermentación de cacao.....	21
2.7 Factores que influyen en el proceso fermentativo del cacao	21
2.8 Producción de precursores de aroma durante la fermentación	23
2.9 Microorganismos iniciadores de la fermentación en cacao	24
CAPÍTULO III: DISEÑO METODOLÓGICO	26
3.1 Selección de cepas para la fermentación de cacao.....	28
3.2 Condiciones óptimas para el desarrollo de los microorganismos iniciadores de la fermentación.....	28
3.3 Métodos de fermentación sin y con cultivos iniciadores	29
3.3.1 Fermentación por el método de cajón y montón sin cultivos iniciadores	30
3.3.2 Fermentación por el método de cajón y montón con cultivos iniciadores	32
3.4 Metodología: análisis de la calidad del cacao fermentado	36
3.4.1 Humedad, pH y acidez titulable, acidez libre, acidez total y acidez volátil	36
3.4.1.1 Humedad.....	37
3.4.1.2 pH y acidez titulable.....	37
3.4.1.3 Acidez libre y acidez total	38
3.4.3 Determinación del grado de fermentación	38
3.4.5 Cuantificación e identificación de cepas durante la fermentación mediante conteo de placa y por macro - microscopia.....	42
CAPÍTULO IV: RESULTADOS	51
4.1 Resultados y discusión de los resultados.....	51
4.2 Tiempo y Calidad de la Fermentación.....	61
4.3 Comparación del Uso de Cultivos Iniciadores en la Fermentación del cacao tanto por el Método Cajón como el de Montón o Tendal.....	62
4.4 Costos de Producción de la Utilización de Cultivos Iniciadoras en el Cacao.	62
CAPÍTULO V: CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....	63

5.1 Conclusiones.....	63
5.2 Recomendaciones.....	64
5.3 Bibliografía.....	65
5.4 Apéndice.....	70

Índice de Cuadros

CUADRO 1 DISEÑO EXPERIMENTAL DEL PROCESO.....	27
CUADRO 2 PREPARACIÓN DE INÓCULOS PARA EL ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO	28
CUADRO 3 EQUIPOS, MATERIALES Y PROCEDIMIENTO PARA LA DETERMINACIÓN DE HUMEDAD (INIAP, 2016).....	70
CUADRO 4 EQUIPOS, MATERIALES Y PROCEDIMIENTO PARA LA DETERMINACIÓN DE PH Y ACIDEZ TITULABLE (Armijos, 2002).....	71
CUADRO 5 EQUIPOS, MATERIALES Y PROCEDIMIENTO PARA LA DETERMINACIÓN DE ACIDEZ LIBRE Y TOTAL (Pontillon, 1997).....	72
CUADRO 6 PRUEBAS MORFOLÓGICAS PARA LA IDENTIFICACIÓN DE CEPAS	73

Índice de Tablas

TABLA 1 FACTORES AGROAMBIENTALES PARA EL CULTIVO DE CACAO	10
Tabla 2 CARACTERÍSTICAS DEL GRANO DE CACAO BIEN FERMENTADO, LIGERAMENTE FERMENTADO Y SIN FERMENTAR .	17
Tabla 3 PORCENTAJES DE COMPUESTOS QUÍMICOS EN EL CACAO	19
Tabla 4 PORCENTAJES DE COMPUESTOS QUÍMICOS EN LA MANTECA DE CACAO	20
TABLA 5 PORCENTAJES DE COMPUESTOS QUÍMICOS EN EL POLVO DE CACAO.....	20
TABLA 6 COMPOSICIÓN QUÍMICA DE PULPA DE CACAO (G/100G DE PULPA FRESCA).....	21
TABLA 7 REACCIONES Y MICROORGANISMOS PRESENTES EN LA FERMENTACIÓN DE CACAO.....	25
TABLA 8 CONDICIONES ÓPTIMAS PARA EL DESARROLLO DE LOS MICROORGANISMOS INICIADORES DE LA FERMENTACIÓN DEL CACAO	29
TABLA 9 CONCENTRACIONES (UFC/ML) DE LA LEVADURA: SACCHAROMYCE CEREVISIAE	34
TABLA 10 CONCENTRACIONES (UFC/ML) DE LA BACTERIA LÁCTICA: LACTOBACILLUS PLANTARUM	35
TABLA 11 CONCENTRACIONES (UFC/ML) DE LA BACTERIA ACÉTICA: ACETOBACTER ACETI.....	35
TABLA 12 CLASIFICACIÓN DE ALMENDRAS DE CACAO POR EL GRADO DE FERMENTACIÓN	40
TABLA 13 . MEDIOS LÍQUIDOS DE CULTIVO: TEMPERATURAS Y TIEMPOS DE INCUBACIÓN POR MICROORGANISMO.....	46
TABLA 14 MEDIOS SÓLIDOS DE CULTIVO: TEMPERATURAS Y TIEMPOS DE INCUBACIÓN POR MICROORGANISMO.....	46
TABLA 15 MICROORGANISMOS Y MORFOLOGÍAS DE SUS COLONIAS	47
TABLA 16 COMPARACIÓN DE MEDIAS EN LA FERMENTACIÓN CON CULTIVOS POR EL MÉTODO DE CAJÓN.....	52
TABLA 17 COMPARACIÓN DE MEDIAS EN LA FERMENTACIÓN SIN CULTIVOS POR EL MÉTODO DE CAJÓN.....	52
TABLA 18 COMPARACIÓN DE MEDIAS EN LA FERMENTACIÓN CON CULTIVOS POR EL MÉTODO DE TENDAL O MONTÓN.....	53
TABLA 19 COMPARACIÓN DE MEDIAS EN LA FERMENTACIÓN SIN CULTIVOS POR EL MÉTODO DE TENDAL O MONTÓN.....	53
TABLA 20 ANÁLISIS FÍSICOQUÍMICO DEL CACAO TIPO NACIONAL CLON 103 FERMENTADO POR EL MÉTODO DE CAJÓN SIN CULTIVOS	54

TABLA 21 ANÁLISIS FÍSICOQUÍMICO DEL CACAO TIPO NACIONAL CLON 103 FERMENTADO POR EL MÉTODO DE CAJÓN CON CULTIVOS.....	54
TABLA 22 ANÁLISIS FÍSICOQUÍMICO DEL CACAO TIPO NACIONAL CLON 103 FERMENTADO POR EL MÉTODO DE TENDAL O MONTÓN SIN CULTIVOS.....	55
TABLA 23 ANÁLISIS FÍSICOQUÍMICO DEL CACAO TIPO NACIONAL CLON 103 FERMENTADO POR EL MÉTODO DE TENDAL O MONTÓN CON CULTIV	55
TABLA 24 ANÁLISIS FÍSICOQUÍMICO DEL CACAO TIPO CCN-51 FERMENTADO POR EL MÉTODO DE CAJÓN SIN CULTIVOS.....	56
TABLA 25 ANÁLISIS FÍSICOQUÍMICO DEL CACAO TIPO CCN-51 FERMENTADO POR EL MÉTODO DE CAJÓN CON CULTIVOS.....	56
TABLA 26 ANÁLISIS FÍSICOQUÍMICO DEL CACAO TIPO CCN-51 FERMENTADO POR EL MÉTODO DE TENDAL O MONTÓN SIN CULTIVOS.....	57
TABLA 27 ANÁLISIS FÍSICOQUÍMICO DEL CACAO TIPO CCN-51 FERMENTADO POR EL MÉTODO DE TENDAL O MONTÓN CON CULTIVOS.....	57
TABLA 29 DINÁMICA MICROBIANA EN LA FERMENTACIÓN SIN CULTIVOS DEL DÍA 1 EXPRESADO EN [LOG UFC/G].....	76
TABLA 30 DINÁMICA MICROBIANA EN LA FERMENTACIÓN SIN CULTIVOS DEL DÍA 3 EXPRESADO EN [LOG UFC/G].....	76
TABLA 31 DINÁMICA MICROBIANA EN LA FERMENTACIÓN SIN CULTIVOS DEL DÍA 5 EXPRESADO EN [LOG UFC/G].....	76
TABLA 32 DINÁMICA MICROBIANA EN LA FERMENTACIÓN SIN CULTIVOS DEL DÍA 7 EXPRESADO EN [LOG UFC/G].....	77
TABLA 33 PREPARACIÓN ESCALA MCFARLAND	77
TABLA 34 PUNTOS REPRESENTATIVOS DE LA ESCALA MCFARLAND	78
TABLA 35 ANÁLISIS FÍSICOQUÍMICOS DE LOS 8 TRATAMIENTOS ESTABLECIDOS EN LA FERMENTACIÓN CON CULTIVOS INICIADORES.....	79
TABLA 36 ANÁLISIS FÍSICOQUÍMICO DEL CACAO TIPO NACIONAL CLON 103 FERMENTADO POR EL MÉTODO DE CAJÓN.....	80
TABLA 37 ANÁLISIS FÍSICOQUÍMICO DEL CACAO TIPO NACIONAL CLON 103 FERMENTADO POR EL MÉTODO DE TENDAL O MONTÓN.....	80
TABLA 38 ANÁLISIS FÍSICOQUÍMICO DEL CACAO TIPO CCN-51 FERMENTADO POR EL MÉTODO DE CAJÓN.....	81
TABLA 39 ANÁLISIS FÍSICOQUÍMICO DEL CACAO TIPO CCN-51 FERMENTADO POR EL MÉTODO DE TENDAL O MONTÓN.....	82
TABLA 40 DINÁMICA MICROBIANA EN TODOS LOS TRATAMIENTOS DEL DÍA 1 EXPRESADO EN [LOG UFC/G].....	83
TABLA 41 DINÁMICA MICROBIANA EN TODOS LOS TRATAMIENTOS DEL DÍA 3 EXPRESADO EN [LOG UFC/G].....	83

TABLA 42 DINÁMICA MICROBIANA EN TODOS LOS TRATAMIENTOS DEL DÍA 5 EXPRESADO EN [LOG UFC/G].....	84
TABLA 43 DINÁMICA MICROBIANA EN TODOS LOS TRATAMIENTOS DEL DÍA 7 EXPRESADO EN [LOG UFC/G].....	84
TABLA 44 ENSAYO DE CORTE REALIZADAS A LAS FERMENTACIONES SIN CULTIVOS INICIADORES	85
TABLA 45 ENSAYO DE CORTE REALIZADAS A LAS FERMENTACIONES CON CULTIVOS INICIADORES	85
TABLA 46 REQUISITOS DE CALIDAD DEL CACAO EN GRANO BENEFICIADO SEGÚN LA NORMA INEN 176.....	87
TABLA 47 COSTOS DE PRODUCCIÓN DE LA UTILIZACIÓN DE CULTIVOS INICIADORAS EN EL CACAO.....	88

Índice de Gráficos

GRÁFICO 1 COMPARACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE CACAO EN TONELADAS MÉTRICAS.....	7
GRÁFICO 2 COMPARACIÓN PORCENTUAL DE LA PRODUCCIÓN DE CACAO POR PROVINCIA.....	8
GRÁFICO 3 GRANOS CON DIFERENTES NIVELES DE FERMENTACIÓN.....	18
GRÁFICO 4 COMPARACIÓN DE MEDIAS EN SPSS STATISTICS	51
GRÁFICO 5 RECUENTO DE MICROORGANISMOS (LOG UFC/G) DE LEVADURAS EN LA FERMENTACIÓN DE SIN CULTIVOS	58
GRÁFICO 6 RECUENTO DE MICROORGANISMOS (LOG UFC/G) DE BACTERIAS ACÉTICAS EN LA FERMENTACIÓN DE SIN CULTIVOS..	58
GRÁFICO 7 RECUENTO DE MICROORGANISMOS (LOG UFC/G) DE BACTERIAS LÁCTICAS EN LA FERMENTACIÓN DE SIN CULTIVOS..	59
GRÁFICO 8 RECUENTO DE LEVADURAS (LOG UFC/G) DEL DÍA 1 AL DÍA 7.....	60
GRÁFICO 9 RECUENTO DE BACTERIAS LÁCTICAS (LOG UFC/G) DEL DÍA 1 AL DÍA 7.....	60
GRÁFICO 10 RECUENTO DE BACTERIAS ACÉTICAS (LOG UFC/G) DEL DÍA 1 AL DÍA 7.....	61
GRÁFICO 11 ANÁLISIS FÍSICOQUÍMICO DEL CACAO TIPO NACIONAL CLON 103 FERMENTADO POR EL MÉTODO DE CAJÓN.....	74
GRÁFICO 12 ANÁLISIS FÍSICOQUÍMICO DEL CACAO TIPO NACIONAL FERMENTADO POR EL MÉTODO DE TENDAL O MONTÓN.....	74
GRÁFICO 13 ANÁLISIS FÍSICOQUÍMICO DEL CACAO TIPO CCN-51 FERMENTADO POR EL MÉTODO DE CAJÓN.....	75
GRÁFICO 14 ANÁLISIS FÍSICOQUÍMICO DEL CACAO TIPO CCN-51 FERMENTADO POR EL MÉTODO DE TENDAL O MONTÓN.....	75
GRÁFICO 15 ESCALA MCFARLAND	78
GRÁFICO 16 ANÁLISIS FÍSICOQUÍMICO DEL CACAO TIPO NACIONAL CLON 103 FERMENTADO POR EL MÉTODO DE CAJÓN.....	80
GRÁFICO 17 ANÁLISIS FÍSICOQUÍMICO DEL CACAO TIPO NACIONAL CLON 103 FERMENTADO POR EL MÉTODO DE TENDAL O MONTÓN.....	81
GRÁFICO 18 ANÁLISIS FÍSICOQUÍMICO DEL CACAO TIPO CCN-51 FERMENTADO POR EL MÉTODO DE CAJÓN.....	81
GRÁFICO 19 ANÁLISIS FÍSICOQUÍMICO DEL CACAO TIPO CCN-51 FERMENTADO POR EL MÉTODO	82
GRÁFICO 20 HISTOGRAMA: REPRESENTA EL PORCENTAJE DE FERMENTACIÓN EN EL MÉTODO SIN CULTIVOS	86
GRÁFICO 21 HISTOGRAMA: REPRESENTA EL PORCENTAJE DE FERMENTACIÓN EN EL MÉTODO CON CULTIVOS	86

Índice de Fotografías

FOTOGRAFÍA 1 REPRESENTA LAS FOTOGRAFÍAS MICROSCÓPICAS DE LEVADURAS.....	48
FOTOGRAFÍA 2 REPRESENTA LAS COLONIAS DE HONGOS Y LEVADURAS, PRESENTES EN EL PROCESO DE FERMENTACIÓN INCUBADAS POR EL MEDIO PDA AGAR.....	48
FOTOGRAFÍA 3 REPRESENTA LAS FOTOGRAFÍAS MICROSCÓPICAS DE LACTOBACILOS GRAM POSITIVOS, INVOLUCRADOS EN EL PROCESO DE FERMENTACIÓN.....	49
FOTOGRAFÍA 4 REPRESENTA COLONIAS DE BACTERIAS ÁCIDO-LÁCTICAS, PRESENTES EN EL PROCESO DE FERMENTACIÓN INCUBADAS EN MEDIO MRS	49
FOTOGRAFÍA 5 REPRESENTA FOTOGRAFÍAS MICROSCÓPICA DE BACTERIAS ACÉTICAS, GRAM NEGATIVAS, INVOLUCRADAS EN EL PROCESO DE FERMENTACIÓN.....	50
FOTOGRAFÍA 6 REPRESENTA COLONIAS DE BACTERIAS ACIDO ACÉTICAS, PRESENTES EN EL PROCESO DE FERMENTACIÓN, INCUBADAS EN MEDIO MANITOL.....	50
FOTOGRAFÍA 7 PREPARACIÓN DE MEDIOS LÍQUIDOS Y SÓLIDOS Y ESTERILIZACIÓN.....	89
FOTOGRAFÍA 8 DILUCIONES SERIADAS.....	89
FOTOGRAFÍA 9 MEDICIÓN DE TEMPERATURA, PH, % HUMEDAD....	89
FOTOGRAFÍA 10 ACIDEZ LIBRE Y TOTAL	90
FOTOGRAFÍA 11 BENEFICIADO DEL CACAO	90
FOTOGRAFÍA 12 MÉTODOS DE FERMENTACIÓN	90
FOTOGRAFÍA 13 INOCULACIÓN DE MUESTRAS	91
FOTOGRAFÍA 14 RECUENTO MICROBIANO (TPC)	91
FOTOGRAFÍA 15 TINCIÓN DE GRAM.....	91
FOTOGRAFÍA 16 PRUEBA DE CATALASA	92
FOTOGRAFÍA 17 IDENTIFICACIÓN MORFOLÓGICA.....	92
FOTOGRAFÍA 18 PORCENTAJE DE GRANOS FERMENTADOS. PRUEBA DE CORTE	92

Resumen

La fermentación del cacao es un paso fundamental en el proceso post-cosecha de las almendras de cacao, produciéndose cambios físicos químicos que conducen al desarrollo de precursores de aroma y sabor. Es así, como la modificación de la dinámica microbiana durante la fermentación puede alterar la actividad microbiana global; y, por lo tanto, puede afectar al proceso de fermentación. Por ende, se propuso la adición de cultivos iniciadores para mejorar este proceso y analizar los efectos que producen los mismos en las almendras de cacao. La presente investigación se desarrolla en su totalidad con el beneficiado del cacao, fermentación y secado, análisis físicos químicos y microbiológicos, con la finalidad de establecer una comparación del porcentaje de fermentación de las almendras entre la fermentación tradicional y la fermentación con el uso de microorganismos. Se realizó el respectivo aislamiento de las 3 cepas a utilizar (levaduras, bacterias lácticas y acéticas), para luego mediante el método McFarland que consiste en cuantificar las poblaciones microbianas iniciales que se colocarían a los diferentes tratamientos. Se utilizó un esquema de investigación completamente al azar, tanto para las dos variedades de cacao (CCN51 Y Nacional 103), como para los diferentes métodos de fermentación (Cajón y Tendal). Una vez obtenidas las concentraciones microbianas que se encuentran en las Tabla N° 24, 25 y 26, se procedió a inocularlas en las almendras de cacao. Ya finalizado el proceso fermentativo se observó a través de los análisis físicos químicos que el tiempo de fermentación disminuyó, y el grado de fermentación respecto a la fermentación tradicional aumentó significativamente, dándonos como resultado T1-51C 41% ; T2-51C 38% ; T1-51T 67% ; T2-51T 57% ; T1-NC 59% ; T2-NC 75% ; T1-NT 66% ; T2-NT 71% ; en comparación con la tradicional que mostró los siguientes porcentajes para 51C 87% ; 51T 55% ; NC 56% ; NT 46% . En general, el uso de cultivos iniciadores acortó el tiempo de fermentación y aumentó el grado de este en todos los tratamientos.

Palabras claves: fermentación de cacao, cultivos iniciadores, dinámica microbiana, cambios físicos químicos, tiempo de fermentación.

Abstract

The fermentation of cocoa is a fundamental step in the post-harvest process of cocoa almonds, producing chemical changes that lead to the development of aroma and flavor precursors. It is thus, as the modification of the microbial dynamics during the fermentation can change the global microbial activity; and therefore, may affect the fermentation process. Therefore, it was proposed the addition of starter cultures to improve this process and to analyze the effects that they produce in cocoa almonds.

The present research is developed in its entirety with the benefit of cocoa, fermentation and drying, physical chemical and microbiological analysis, to establish a comparison of the percentage of fermentation of almonds between traditional fermentation and fermentation with the use of microorganisms. The respective isolation of the 3 strains to be used (yeast, lactic and acetic bacteria) were carried out, followed by the McFarland method, which consists of calculating the initial microbial populations to be placed in the different treatments. A completely randomized research scheme was used for both the cacao varieties (CCN51 and National 103) and for the different fermentation methods (box fermentations and platform fermentations). Once the microbial concentrations found in Table No. 24, 25 y 26 were obtained, they were inoculated in the cocoa almonds. At the end of the fermentation process, it was observed through physical chemical analysis that the fermentation time decreased, and the degree of fermentation with respect to the traditional fermentation increased significantly, resulting in T1-51C 41%; T2-51C 38%; T1-51T 67%; T2-51T 57%; T1-NC 59%; T2-NC 75%; T1-NT 66%; T2-NT 71%; in comparison with the traditional one that showed the following percentages for 51C 87%; 51T 55%; NC 56%; NT 46%. In general, the use of starter cultures shortened the fermentation time and increased the degree of fermentation in all treatments.

Keywords: cocoa fermentation, starter cultures, microbial dynamics, chemical physical changes, fermentation time.

INTRODUCCIÓN

En la fermentación del cacao existen fases muy importantes en la transformación del grano, donde ocurren varios cambios bioquímicos que dan lugar a los precursores de aroma y sabor importantes en la calidad de las almendras, brindándoles características sensoriales únicas a cacao. Son muchos los factores que influyen en este proceso, como la zona de cultivo, condiciones climáticas, la variedad genética y el manejo post-cosecha, así como la técnica aplicada de fermentación. Adicionalmente, el método fermentativo, volumen de cacao y el volteo durante el proceso pueden afectar la calidad del grano fermentado.

Para la ejecución de esta investigación se analizó en primera instancia las variedades de cacao más productivas en el cultivar del Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias (INIAP) ubicado en Quevedo provincia de los Ríos. Se comenzó con la selección de las mazorcas para ambas variedades (Nacional 103 y CCN51) cuyas mazorcas fueron más productivas durante esa época del año; luego se procedió al pesado de las almendras para luego fermentar los ocho tratamientos previamente inoculadas las cepas (levaduras, bacterias lácticas y acéticas), 4 en Cajones y 4 en Montones para las dos variedades. Diariamente se efectuaron los respectivos análisis en el laboratorio de Fitopatología para analizar el comportamiento microbiano que se desarrolla durante el periodo de fermentación del cacao Nacional 103 (4 días) y CCN51 (7 días), utilizando cuatro tipos de cultivos (Water Peptone, M.R.S, Potato Dextrosa Agar y Manitol) para posteriormente cuantificar y cualificar la presencia de levaduras, bacterias lácticas y acéticas; además se realizaron análisis fisicoquímicos para evaluar uno de los parámetros más importantes como lo es el pH, ya que según (Armijos, 2002) la fermentación finaliza cuando los valores de pH están dentro del rango de 5,1 y 5,4. En el FCC (Fermentación con cultivos) el pH llegó a 5,4 en un corto tiempo respecto al FSC (Fermentación sin cultivos).

CAPÍTULO I: EL PROBLEMA

1.1 Planteamiento del problema

Uno de los principales problemas en el cultivo de cacao en el Ecuador es el incorrecto manejo post-cosecha que se realiza al cacao durante el proceso de fermentación, etapa crítica que tiene gran incidencia en la formación de compuestos aromáticos que finalmente repercute en la calidad del producto final. El atributo sensorial del cual se debe el precio de las almendras de cacao es el aroma a chocolate, producidos por alrededor de 400 compuestos volátiles (SINAGAP, 2015), que se desarrollan durante las etapas de fermentación, por ello una fermentación inadecuada o la falta de esta influirán de manera negativa en la calidad sensorial de la almendra.

Muchos microorganismos fermentadores han sido reportados como productores de compuestos volátiles durante la fermentación del cacao (Thompson R. , 2001). Schwan y Wheals (2004) informaron que *Kloeckera apiculata* y *Saccharomyces cerevisiae var* son los productores más importantes de compuestos volátiles (Lefeber et.al De Vuyst, 2011). Varios autores han usado cepas específicas de *Lactobacillus plantarum* y *Lactobacillus fermentum* como cultivos de fermentación (Kresnowati, 2013), mezcladas con bacterias de ácido acético (AAB) *Acetobacter aceti* y *Gluconobacter oxydans* (Schwan, 1998).

La presencia de levaduras, bacterias de ácido láctico (LAB) y bacterias de ácido acético (AAB) intervienen de manera positiva en la formación de aromas durante los procesos de fermentación (Pereira G, 2012). También afectan positivamente la concentración de polifenoles y desarrollan los precursores de sabor, mientras que las esporas aeróbicas de bacterias y mohos tienen un efecto negativo. Los procedimientos utilizados durante el proceso de fermentación y secado producen una disminución significativa de polifenoles y el desarrollo de sabores deseables (Mozzi, 2015).

Las investigaciones realizadas muestran la importancia de los microorganismos en la fermentación de cacao por lo que el presente trabajo de titulación busca utilizar una combinación adecuada de cultivos iniciadores con el objetivo de mejorar la calidad de la fermentación de cacao ecuatoriano.

1.2 Diagnóstico del problema

Hoy en día los consumidores requieren cada vez más productos de cacao de alta calidad, chocolates de un origen único y otros chocolates de primera, donde el procesamiento del cacao se beneficia de las tecnologías más recientes, así como la calidad de las materias primas para la fabricación del chocolate pueden mejorarse mediante procesos de post-cosecha mejor controlados, como la fermentación y el secado de las almendras (Beckett, 2009). Después de la apertura de las mazorcas inicia inmediatamente la fermentación que suele durar entre 4 a 6 días dependiendo de la variedad, donde la pulpa se descompone mediante la acción microbiana, en conjunto, se inician cambios bioquímicos en el interior de los granos de cacao que contribuyen a la reducción de su amargor y astringencia mejorando su sabor y color. El sabor de las almendras de cacao depende en su mayoría del material genético del árbol de cacao, el cual se desarrolla tanto de las prácticas agrícolas como del proceso de fermentación. Considerando que no es práctico poder mejorar las materias primas con una calidad inferior, utilizando un procesamiento estándar y una fermentación o secado descuidado podrían afectar irremediablemente los granos de cacao fermentados y secos de buena calidad (Thompson, Miller, & Lopez, 2001). Los métodos de fermentación de cacao varían considerablemente según la región o país, que van desde cantidades a pequeña y gran escala hasta las tecnologías más actualizadas. Una técnica tradicional aplicada en Ecuador para la producción de cacao “Arriba” es la fermentación en plataformas, de acuerdo con este procedimiento, las almendras se suelen extender sobre plataformas durante el día y se amontonan en la noche para que vaya disminuyendo la pulpa mucilaginoso, y por ende facilitar el secado, por lo tanto, las fermentaciones son cortas (96 h en lugar de las 144 h tradicionales). Sin embargo, esta técnica de fermentación está desapareciendo y se utiliza para pequeñas cantidades de almendras, y la fermentación en cajas para grandes cantidades que se practica generalmente en granjas.

En general, nuestro país produce mayormente dos tipos de cacao, el Nacional Trinitario (cacao fino, sabor “Arriba” de alta calidad) y CCN51 (híbrido de cacao Trinitario, de alto rendimiento). El cacao Nacional se cultiva bajo sistemas de poco rendimiento representando aproximadamente el 85% del cacao cultivado en Ecuador, mientras que el CCN51 es cultivado bajo sistemas de alto rendimiento. Desgraciadamente, el cacao ecuatoriano suele ser poco fermentado y de baja calidad, lo que explica su bajo precio en el mercado mundial, por ello es necesario aumentar la calidad y por ende la productividad del sector cacaotero del país (Jano & Mainville, 2007).

1.3 Objetivos

1.3.1 Objetivo general

- ✓ Analizar el comportamiento de cultivos iniciadores durante la fermentación en Cajón y en Tendales utilizando como muestra a fermentar el Cacao Tipo Nacional Clon 103 y CCN51.

1.3.2 Objetivos específicos

- ✓ Determinar una proporción adecuada de cepas iniciadoras en la fermentación del cacao que desarrolle las características de calidad del cacao en grano beneficiado.
- ✓ Disminuir el tiempo de fermentación con el uso de cultivos iniciadores.
- ✓ Evaluar los factores físicos y químicos que intervienen en el proceso fermentativo de cada genotipo.

1.4 Justificación e importancia

La presente investigación tiene como objetivo establecer un método experimental que ayude a la fermentación del cacao para obtener así un producto de alta calidad en el cual se desarrollará el uso de condiciones óptimas de crecimiento para las cepas.

Actualmente, los diferentes métodos de fermentación se vienen realizando bajo el método tradicional de una forma deficiente, por lo que en la presente investigación se pretende encontrar una combinación adecuada de cultivos iniciadores en la fermentación del cacao para así contribuir a la optimización y mejoramiento en la calidad de este.

Estudios recientes demuestran que la fermentación del cacao es un proceso complejo, el cual implica acciones de levaduras, bacterias ácido lácticas y ácido acéticas, esenciales en la fermentación de cacao lo cual nos indica que es un proyecto viable, por ello esta propuesta pretende evaluar la aplicación de microorganismos en la fermentación del cacao de las variedades CCN-51 y Nacional 103, en el cual se estudiará el efecto de levaduras, bacterias lácticas y acéticas, por ende, se obtendrán grandes beneficios como mantener y mejorar la calidad del producto tanto en sus aspectos físicos, como químicos.

1.5 Hipótesis

La metodología utilizada en la fermentación de cacao origina procesos heterogéneos debido a la variedad de cepas presentes durante la fermentación, el uso de cepas starters podría evitar fermentaciones heterogéneas y estandarizar el proceso de fermentación de las variedades Nacional 103 y CCN51 de cacao ecuatoriano.

CAPÍTULO II: REVISIÓN DE LITERATURA

2.1 Historia del cacao

Según lo citado por (Historia del cacao, 2013) hace más de 2500 años el cacao ya era cultivado por los mayas. De hecho, para encontrar el significado de la palabra cacao se hace recurrente ir a la lengua maya, donde: cac que en lengua maya quiere decir rojo (en referencia al color de la cáscara del fruto) y cau que expresa las ideas de fuerza y fuego. Sin embargo, según lo citado por (Guerrero, 2015) en la Revista Lideres recientes investigaciones indican que al menos una variedad de cacao tiene su origen en la Alta Amazonía.

Los aztecas hacían el chocolate inicialmente con el simple moldeado de granos de cacao tostados ya que así se producía una pasta aceitosa, oscura y amarga que es el chocolate puro y en bruto que, licuado por calor, edulcorado con miel y aromatizado con vainilla era como se lo tomaban los aztecas (Historia del cacao, 2013). Los europeos sustituyeron la miel por azúcar y utilizaron la canela como aromatizante. En esa época el chocolate se difunde en forma sólida y compacta (a la piedra).

Cuando los españoles llegaron a América, los granos de cacao eran usados como moneda, costumbre que perduró mucho después de la colonización de los españoles. De hecho, Hernán Cortés pagaba a sus soldados con cacao. Sin embargo, durante toda la edad moderna el cacao pasó bastante desapercibido, a pesar de que ya en el siglo XVI empezaba a ser conocida la bebida hecha a base de cacao (el chocolate). Restringida sólo a la élite aristocrática, poco a poco adquiere prestigio como estimulante y se extiende por toda Europa.

No es hasta el inicio de era contemporánea, principios del siglo XIX que el chocolate se hace más popular gracias a la aparición de la industria chocolatera. Por aquel entonces se descubre la posibilidad de separar la parte aceitosa de la pasta de cacao (la manteca de cacao), operación que deja unos polvos secos y solubles en agua o leche (cacao en polvo).

Pero según (Guerrero, 2015) fue recién a finales del siglo XIX que luego de varias experimentaciones realizados por los suizos, hicieron dos grandes descubrimientos:

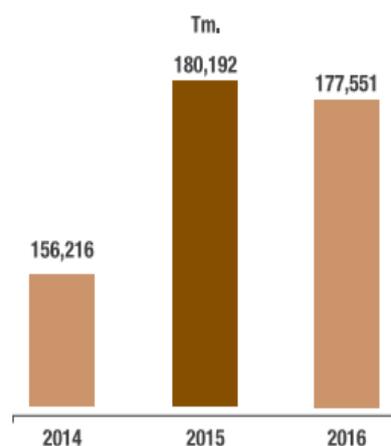
1) En 1840, el suizo Rudolf Lindt mezcla la manteca de cacao con la pasta de cacao, obteniendo un chocolate más dulce que es el que usamos actualmente.

2) En 1875 el suizo Daniel Peter descubre un nuevo método de condensación de leche, que otro suizo, Henry Nestlé en 1905, aplica al chocolate. Nació entonces el famoso chocolate con leche, empezando así una industria mundial.

2.2 Producción de cacao actual en el Ecuador

Los análisis estadísticos realizados por (ProEcuador, 2017) en el año 2016, Ecuador tuvo una producción de 177,551 toneladas métricas, un 1.5% menos en relación con el año 2015 como da a notar la Gráfico N° 1, esto debido a factores climatológicos que afectaron a la producción. Pero a pesar de los problemas de la época invernal, comparando con las producciones de los países de la región, Ecuador se destaca como un productor neto de cacao.

GRÁFICO 1 COMPARACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE CACAO EN TONELADAS MÉTRICAS



Fuente: Encuesta de Superficie y Producción Agropecuaria Continua, ESPAC.

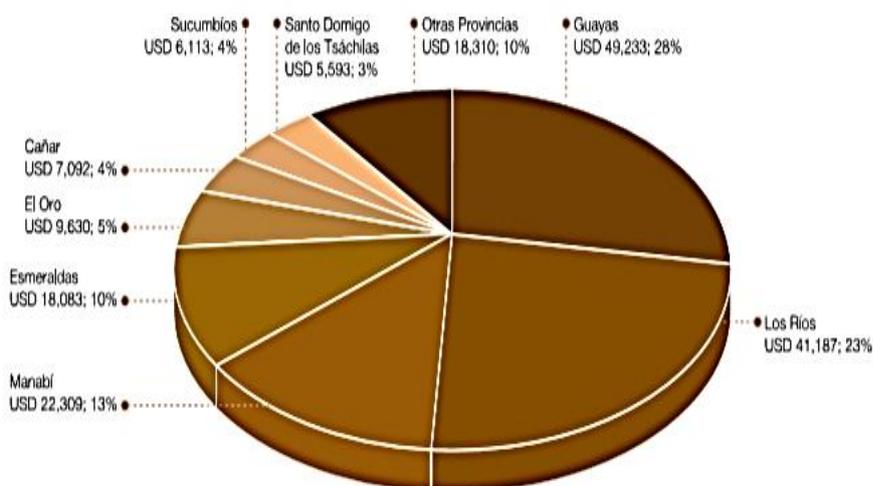
Elaboración: Dirección de Inteligencia Comercial e Inversiones, PRO ECUADOR

(ProEcuador, 2017), en su revista “Perfil Sectorial de cacao y elaborados 2017” reveló los siguientes análisis estadísticos con respecto a la producción de cacao conforme a las provincias:

Guayas es la principal provincia productora de cacao en el país, es así como durante el 2016 tuvo una producción total de 49 mil toneladas representando el 28% del total nacional, seguido por Los Ríos con el 23% y en tercer lugar Manabí con el 13%.

Estas 3 provincias sumaron una producción de 113 mil toneladas de cacao durante el último año.

GRÁFICO 2 COMPARACIÓN PORCENTUAL DE LA PRODUCCIÓN DE CACAO POR PROVINCIA



Fuente: Encuesta de Superficie y Producción Agropecuaria Continua, ESPAC.

Elaboración: Dirección de Inteligencia Comercial e Inversiones, PRO ECUADOR.

2.3 Variedades de cacao

El cacao como cualquier otro tipo de planta posee diversas variedades lo que influye en gran medida en sus propiedades organolépticas tanto en

sabor y aroma, estos son aspectos importantes que tanto el consumidor como el catador deben tener en cuenta.

Antiguamente se identificaron tres grupos de cacao: el cacao Criollo, el cacao Forastero y de la mezcla de estos nació el cacao Trinitario (Erazo & Mendoza, 2015) mediante marcadores bioquímicos y moleculares.

Asimismo, al final de otro estudio molecular, se concluyó que el cacao Nacional es genéticamente diferente del Forastero, Criollo y Trinitario citado por (Amores, Palacios, Jimenez, & Zhang, 2009), así también como en sus propiedades organolépticas.

Según (Presilla, 2015) Ecuador se destaca por poseer las dos mejores variedades del mundo: el CCN 51 y el nacional siendo el primero indispensable en la elaboración de los mejores y más finos chocolates del mundo por poseer un penetrante aroma floral y sabor frutal único.

Cacao Fino de Aroma: Es el único grupo natural de cacao que se cultiva en el occidente de Ecuador; las almendras son grandes y de color morado pálido u oscuro o marrón; las semillas se fermentan de cuatro a cinco días y tienen un intenso aroma floral (García, 2008), también es conocido como Nacional cuyo color característico es el amarillo, posee un aroma y sabor único, siendo esencial para la producción del exquisito chocolate gourmet apetecido a nivel mundial.

Cacao CCN-51: es un cacao clonado de origen ecuatoriano cuyo origen genético de este clon es fruto del cruzamiento entre IMC-67 (Amazónico) x ICS-95 (Trinitario), conocido también como Colección Castro Naranjal cuyo color característico es el rojo y tiene un periodo de fermentación de 5 a 6 días. Además, es reconocido por sus características de alto rendimiento para la extracción de semielaborados, ingredientes esenciales para la producción a escala de chocolates y otros.

Cacao Criollo: se desarrolla bajo condiciones semi-silvestre y se distribuyen desde México hasta Colombia y Venezuela; las almendras son generalmente grandes y gruesas, con cotiledones blancos o rosados; este tipo de cacao requiere de tres a cuatro días para completar su fermentación, por su sabor y aroma se enmarca en los llamados cacaos finos (García, 2008).

Cacao Forastero: se desarrolla al estado silvestre y domesticado en la Amazonía Alta (Perú, Ecuador y Colombia), en la Amazonia Baja (Brasil,

Surinam, Guyana Francesa), y a lo largo del Orinoco (Venezuela) (García, 2008). Las almendras son aplanadas o intermedias con cotiledones de color morado, sus almendras producen un chocolate con sabor y aroma corriente; este tipo de cacao requiere de cinco a siete días para completar su fermentación (García, 2008).

Cacao Trinitario: Son árboles que nunca se han desarrollado en estado silvestre y que por lo general gozan de características intermedias entre los Criollos y Forasteros; las almendras son de tamaño variable con cotiledones color morado; al procesarse desarrollan un sabor y aroma a chocolate fino; este tipo de cacao requiere de cinco a seis días para completar su fermentación (García, 2008).

2.4 Requerimientos agroclimáticos

Según (Enríquez G. A., 1966) entre los factores ecológicos de mayor importancia para el cultivo de cacao figuran: la temperatura y las lluvias como factores climáticos críticos, por lo tanto, se debe restringir algunas zonas para su cultivo.

(AGROCALIDAD, 2012) Menciona otros factores agroambientales para tener en cuenta para el cultivo y se describen a continuación en la Tabla N°1:

TABLA 1 FACTORES AGROAMBIENTALES PARA EL CULTIVO DE CACAO

Temperatura	24 - 26 °C
Altitud	Hasta los 1200m
Precipitación	1500 -2000 mm/año
Humedad	70 - 85 %
Viento	Máx. 5m/s
Suelo	Profundo 0,8 - 1,5 m
Textura	Francos, francos limosa, franco arcillosa
Topografía	Planos hasta 30 % pendiente
Materia orgánica	3 - 5 %
pH	6.0 - 7.0

Fuente: (Erazo & Mendoza, 2015)

2.5 Manejo post-cosecha del cacao

2.5.1 Cosecha y recolección

Según lo citado por (FAO, 2012) la etapa de cosecha es la separación de la planta madre de la porción vegetal de interés comercial, que pueden ser frutos, raíces y hojas, así también es el fin de la etapa del cultivo y el inicio de la preparación o acondicionamiento para el mercado.

Existen dos sistemas de cosecha: manual y mecanizada. La elección de un sistema u otro depende fundamentalmente del cultivo considerado, del destino y muy especialmente del tamaño del predio a ser cosechado. La cosecha manual es el sistema predominante para la recolección de frutas y hortalizas para el consumo en fresco, mientras que la mecánica es preferida en hortalizas con fines industriales y en algunas otras cultivadas normalmente en grandes extensiones. Para ambos sistemas de cosecha, se debe llevar a cabo la identificación de mazorcas maduras e ir eliminando aquellas dañadas por roedores, insectos, y las que están afectadas por escoba de bruja (*Moniliophthora perniciosa* Stahel), por monilla (*Moniliophthora roreri* (Cif y Par) Evans et al.) y otras enfermedades (Agrocalidad, 2012).

Las mazorcas maduras se identifican por cambios en su coloración que varía dependiendo del tipo o variedad de cacao. La cosecha de cacao consiste en la recolección de mazorcas maduras y sanas. Usualmente se realiza con intervalos de 15 días para obtener un producto uniforme.

2.5.2. Desgrane

(Cubillos, Menizalde, & Correa, 2008), informan que, por lo general, la herramienta más usada para partir las mazorcas es el machete. Sin embargo, esta herramienta tiene varios inconvenientes como es: el riesgo para el operario, la posibilidad de cortar los granos y el bajo rendimiento es por ello que en algunas regiones se emplea un dispositivo muy sencillo que consiste en un machete incrustado por la parte afilada a un trozo de tabla vertical debidamente apoyado sobre un trozo de tabla horizontal, esta tiene posee varias ventajas el cual se basan en la seguridad para el operador, en la rapidez de la operación y en la disminución del daño a los granos.

Los granos se extraen con los dedos dejando la placenta pegada a la mazorca y se eliminan pedazos de corteza, hojas, etc., mezclados con los granos. Para esta operación se acostumbra a utilizar un guante que evita el desgarre de las uñas. Es recomendable que después de abrir las mazorcas, los granos deben fermentarse antes de 24 horas según lo

indicado por (Cubillos, Menizalde, & Correa, 2008) y bajo ningún motivo se pueden mezclar granos procedentes de mazorcas abiertas en diferentes días, es por ello que se debe desgranar en contenedores separados los granos sanos y los de apariencia alterada, los cuales deben fermentarse y secarse aparte.

2.5.3. Fermentación

2.5.3.1 Proceso de fermentación de cacao

Según Wachter M. en su artículo Microorganismos y Chocolate, el proceso de fermentación del cacao es natural o espontáneo (Wachter, 2011), esto se debe a que los microorganismos no son añadidos intencionalmente al grano, de hecho, se encuentran estériles dentro de las vainas. El mismo se contamina con microorganismos provenientes de todo tipo de superficie externa con las que entran en contacto entre ellos se encuentran los utensilios, el suelo y las manos de las personas que manipulan el cacao.

La fermentación del cacao es un proceso complejo que implica microbiológicamente las acciones de las levaduras, y las actividades de las bacterias ácido lácticas (BAL) y bacterias ácido acético (BAA) (ERAZO TORRES, 2015), es una etapa muy importante en el procesamiento de las almendras, ya que da inicio a las reacciones bioquímicas, llevando a la formación de moléculas precursoras para el desarrollo de un color, sabor y olor característico de las mismas que en condiciones controladas permitirá obtener un cacao de buena calidad y de características homogéneas.

El proceso fermentativo del cacao se lleva a cabo en 4 fases los cuales se describen a continuación:

Primera fase: La pulpa es rica en carbohidratos y tiene un pH bajo. En esas condiciones se favorece el desarrollo de levaduras.

En la primera fase emergen entre 5 y 6 especies diferentes de levaduras, que luego desaparecen dejando su lugar a *Hanseniáspora guilliermondii*, que es la levadura predominante durante las primeras 24 horas. La *Hanseniáspora* sólo se le encuentra ocasionalmente en las fases posteriores (Delgado, 2012). Las levaduras *Cándida silvae*, *Cándida zemplinina* y *Cándida diversa* se encuentran comúnmente en las fermentaciones en charolas, posiblemente por la mayor concentración de oxígeno en ese tipo de fermentación.

Durante las primeras 36-38 horas de la fermentación en charolas predomina la *Saccharomyces cerevisiae*, por otra parte, en las

fermentaciones por pilas (sacos, cajones de tipo tina), predomina la *Pichia kudriavzevii*, *Saccharomyces cerevisiae* y *Hanseniaspora opuntiae*

En la primera fase de la fermentación del cacao participan un gran número de especies de microorganismos, algunos de los cuales no se han reportado en otros ambientes o fueron aislados inicialmente del cacao, este es el caso de nuevas levaduras como *Cándida halmiae*, *Geotrichum ghanense*, *Cándida awuuii* (Delgado, 2012).

Segunda fase: En la segunda fase del proceso de fermentación del cacao, se favorece el desarrollo de bacterias ácido lácticas.

En las fermentaciones de pilas se han aislado sobre todo bacterias del tipo *Lactobacilos* (*Lb. collonides*, *Lb. fermentum*, *Lb. mali* y *Lb. plantarum*), aunque también se han identificado bacterias como *Leuconostoc pseudomesenteroides*, *Leuconostoc pseudoficulneum*, y *Pediococcus acidilactici*. Por otro lado, *Lb. fermentum* y *Lb. plantarum* son los que mayormente se desarrollan en este tipo de fermentación (Delgado, 2012). Las levaduras contienen enzimas del tipo pectinolíticas, lo que les permite hidrolizar las pectinas, ocasionando una disminución de la viscosidad de la pulpa de mucílago y favoreciendo la entrada de aire. Con este ambiente aerobio y menos ácido debido al consumo de ácido cítrico se favorece el desarrollo de bacterias acéticas.

Tercera fase: En la tercera fase del proceso de fermentación ocurre un cambio importante en términos de los productos de la fermentación, ya que intervienen bacterias acéticas.

Estas llevan a cabo la transformación del etanol que produjeron las levaduras en ácido acético, tal como ocurre en la industria productora de vinagre. En el cual a partir de reacciones exotérmicas el alcohol se transforma en ácido acético. El etanol y el ácido se difunden hacia el interior de los granos y, junto con la temperatura alta (45 – 50 °C) matan el germen y se da a la liberación de enzimas. Esto da inicio a las reacciones bioquímicas líder en la formación esencial de los precursores del aroma, color y sabor en el cacao (Nielsen, 2015). Las más importantes bacterias acéticas que se han aislado de la fermentación del cacao pertenecen al grupo y género de: *Gluconobacter oxydans*.

Cuarta fase: Se desarrolla entre las 48 y las 60 horas, se detectan bacterias del género *Bacillus*.

Al voltear la pila de granos, se favorece la presencia, en las partes externas, de *B. licheniformis*, *B. megaterium*, *B. pumilus* y un grupo pequeño de *B. subtilis*, *B. megaterium* y *B. pumilus*. La temperatura alta favorece el desarrollo de bacterias del género *Bacillus*, conocido por la

producción de numerosas enzimas, que catalizan reacciones cuyos productos dan al cacao sabores y olores desagradables, pero podrían contribuir en el sabor con la producción de ácidos orgánicos (Wacher, 2011).

2.5.3.2 Métodos de fermentación

Fermentación en Montón: este método es uno de los más utilizados por los pequeños agricultores, el mismo consiste en amontonar las almendras de cacao sobre una mesa de madera de forma que facilite el drenaje de su exudado, luego el montón se cubre con hojas de plátano para que produzcan calor. Los intervalos de tiempo en que se efectúan las remociones dependen en gran medida de la variedad de cacao sometida al proceso de fermentación, los cuales habitualmente se efectúan a intervalos de 48, 72 y 96 horas (Llerena, 2016), por cual los granos que se encuentran en el centro del montón son los que se fermentan con mayor rapidez y de mejor manera, por lo que es necesario que la remoción se realice de manera homogénea, para que todos los granos se fermenten de manera uniforme. Es así como este método posee la ventaja de fermentar cualquier volumen, ocasionando costos bajos.

Fermentación en Cajón: este método consiste en colocar las almendras de cacao, las cuales han sido extraídas de las mazorcas con anterioridad en cajas de madera para luego taparlas con hojas de plátanos o sacos de yute para elevar la temperatura de la masa y ocurra el proceso de fermentación. Generalmente las cajas son de madera y deben tener orificios o ranuras para que facilite el drenaje del exudado de la almendra. Así mismo los intervalos de tiempo en que se efectúan las remociones dependen en gran medida de la variedad de cacao sometida al proceso de fermentación, los cuales habitualmente se efectúan a intervalos de 48, 72 y 96 horas. Según (Llerena, 2016) existen dos variables que afectan la fermentación en este tipo de fermentador, que son: La profundidad de la masa de almendras, que debe tener un espesor mínimo de 20 cm y la duración de la fermentación, que debe ser la precisa para el tipo de cacao.

Fermentación en Sacos: este proceso consiste en colocar las almendras de cacao en costales de polietileno o yute para así permitir el fluido normal de los líquidos de las almendras recién cosechadas (Rivadeneria, 2013). Los sacos se cierran y se los deja fermentando en el piso, cuyo objetivo de este proceso es darle una mejor aireación. Varios agricultores coinciden que este método no es recomendable debido a que una vez pasado el periodo de fermentación, las almendras presentan un elevado de granos violáceos y pizarrosos.

2.5.4 Secado

El objetivo primordial del secado es que el cacao termine de desarrollar el sabor a chocolate que inició durante la fermentación (Enríquez G. A., 1966). Este proceso se lo realiza después de la fermentación del cacao el cual debe ser secado inmediatamente, no solo para sacar la humedad del grano (debe obtener un porcentaje de humedad del 7%, ya que si poseen un porcentaje de humedad mayor al 8% puede ser propenso a obtener granos mohosos, tampoco debe estar por debajo del 6%, porque los granos se vuelven frágiles y quebradizos) según lo citado por (Cubillos, Menizalde, & Correa, 2008) , sino también, para que continúen algunas reacciones bioquímicas que finalmente producirán los precursores del sabor. Es tan importante el secado como una buena fermentación.

Los agricultores realizan el secado normalmente al sol sobre plataformas de madera. Para que el proceso sea uniforme, en los primeros días los granos se deben revolver con poca frecuencia y en los días siguientes con mayor frecuencia hasta terminar el proceso.

Por otra parte, en los centros de acopio hay túneles de secado, estas son unas especies de casetas que tienen el esqueleto de madera y están forradas con plástico transparente cuyo objetivo es impedir el ingreso de gallinas, perros, roedores y otros animales, evitando así la contaminación de los granos, es por ello que para construir las bandejas de secado se utilizan tablas de madera de laurel u otras especies que no le dejen olores al cacao. El fondo de la bandeja de secado puede ser de madera o malla acerada para que deje pasar el aire. Otro factor importante de este sistema de secado es el piso del túnel es cuál debe ser de concreto para así disminuir la humedad del ambiente.

Según (Cubillos, Menizalde, & Correa, 2008) la mejor señal de que el secado ha terminado es el resquebrajamiento o crujido que se siente al apretar un puñado de los granos en las primeras horas de la mañana. Al terminar el secado, en el interior de los granos se desarrolla la estructura arriñonada y el color pardo típico del cacao bien beneficiado.

2.5.5 Selección y clasificación

Una vez culminado el proceso de secado, hay que someter los granos a una minuciosa limpieza eliminando todos los materiales extraños mezclados con ellos (pedazos de corteza, placenta, etc.), granos negros, mohosos, dañados por insectos, quebrados, arrugados, pegados, pedazos de cascarilla y polvo. Normalmente se emplean tamices que permiten hacer la separación y ventiladores para soplar el polvo y pedazos de cascarilla y cuando sea necesario, el grano se pasa por zarandas o tamices

específicos para separar el cacao de primera calidad de la “pasilla” (granos con menos del 50% de almendra). Para este efecto según (Cubillos, Menizalde, & Correa, 2008) se acostumbra la zaranda No. 6 que es especial para cacao. El cacao de primera calidad está compuesto de granos enteros con un margen amplio de tamaño.

Cabe mencionar que esta selección y clasificación se realiza bajo la Norma Técnica Ecuatoriana (NTE INEN 176, 2006) Cacao en grano-Requisitos de calidad, la misma tiene como objetivo establecer los requisitos de calidad que debe cumplir el cacao en grano beneficiado y los criterios que deben aplicarse para su clasificación, la misma se aplica al cacao beneficiado, destinado para fines de comercialización interna y externa.

Entre sus requisitos de calidad, para la clasificación de granos de cacao tenemos:

- ✓ Grano mohoso. Grano que ha sufrido deterioro parcial o total en su estructura interna debido a la acción de hongos, determinado mediante prueba de corte.
- ✓ Grano pizarroso (pastoso). Es un grano sin fermentar, que, al ser cortado longitudinalmente, presenta en su interior un color gris negruzco o verdoso y de aspecto compacto.
- ✓ Grano violeta. Grano cuyos cotiledones presentan un color violeta intenso, debido al mal manejo durante el beneficiado.
- ✓ Grano ligeramente fermentado. Grano cuyos cotiledones ligeramente estriados presentan un color ligeramente violeta, debido al mal manejo durante el beneficiado.
- ✓ Grano de buena fermentación. Grano fermentado cuyos cotiledones presentan en su totalidad una coloración marrón o marrón rojiza y estrías de fermentación profunda. Para el tipo CCN51 la coloración variará de marrón a marrón violeta.

2.5.6 Empaque y almacenamiento

Una vez que las almendras estén limpias, clasificadas, secas y hayan alcanzado un porcentaje de humedad entre 6 a 7 %, éstas, se empaquetan en sacos o costales de fique o yute nuevos o en perfecto estado, que no se hayan empleado antes para empaquetar productos con olores penetrantes. Con respecto a su almacenamiento, se los debe colocar en bodegas adecuadas y seguras ya que las almendras que no hayan tenido un buen proceso de secado estarán propensas a la proliferación de mohos y a infestarse de insectos, es por ellos que lo más aconsejable es comercializar

el grano inmediatamente después de su empaque en los mercados locales o en las agencias directas de los fabricantes.

2.6 Calidad del cacao

2.6.1 Calidad física de las almendras de cacao

El componente físico de la calidad comprende fundamentalmente: el tamaño de la almendra, coloración externa e interna, grado de fermentación, peso promedio de una almendra, contenido de cascara de la misma, contenido de humedad, defectos, impurezas y materias extrañas (FUNDACITE, 2005). Una vez que se han cumplido los días de la fermentación, se hace la llamada una prueba de corte para saber si el cacao ha fermentado bien.

Entre las características del grano de cacao que ha sido fermentado y beneficiado de manera correcta, tenemos:

Tabla 2 CARACTERÍSTICAS DEL GRANO DE CACAO BIEN FERMENTADO, LIGERAMENTE FERMENTADO Y SIN FERMENTAR

Características del grano seco	Grano bien fermentado	Grano que le faltó fermentado	Grano sin fermentar
Forma	Hinchado	Algo aplanado o pacho	Aplanado o pachito
Color del grano por fuera	Café oscuro	Amarillo claro, amarillo rojizo	Blanquecino o rojizo
Cascarilla	Se desprende fácilmente al tocarla con los dedos	Es difícil arrancarla con las uñas	No se desprende. Está pegada al grano
Consistencia	Fácil de quebrar y desbaratar con los dedos	Se desbarata con los dedos	Es duro como de hule, sólo se puede partir con navaja
El grano por dentro	Está todo quebradito	No presenta quebradura	Muy duro y sólido
Color del grano por dentro	Color chocolate o café claro	Entre cenizo y morado	Violeta
Olor	A chocolate Aromático Agradable	A vinagre desagradable	Sin olor o con olor a moho
Sabor o gusto	Amargo agradable	Amargo	Muy amargo

Fuente: (Aguilar & Guharay, 2013)

Como la coloración del grano de cacao al final de la fermentación depende en gran medida de tipo de cacao, en la Figura N°1, se muestran granos con diferentes niveles de fermentación.

GRÁFICO 3 GRANOS CON DIFERENTES NIVELES DE FERMENTACIÓN



Fuente: (Aguilar & Guharay, 2013)

2.6.2 Composición química de las almendras de cacao

Según (Braudeau, 1970) los tejidos de los cotiledones están formados por dos tipos de células: células con pigmentos, que conforman los compuestos de polifenoles (taninos, catequinas, antocianinas, leuco antocianinas) y las metilxantinas (teobromina y cafeína), y células de reserva, no coloreadas, que encierran los cristales de manteca de cacao, almidón, proteínas y todas las enzimas.

La composición química de las almendras de cacao depende de varios factores entre ellos: el tipo de cacao, origen geográfico, grado de madurez, calidad de la fermentación y el secado de acuerdo a lo citado por (Wakao, 2002)

Los principales compuestos químicos encontrados en las almendras poseen de alguna manera, influencia en las características organolépticas como en su: amargor, astringencia y acidez del chocolate. (Recalde, 2007).

A continuación, se detallan de manera breve, las reacciones internas que se dan en los tejidos internos de los cotiledones:

Los tejidos de los cotiledones de las almendras están formados principalmente por dos tipos de células; las que contienen polifenoles (taninos, catequinas, antocianinas, leucoantocianinas), purinas (teobromina y cafeína) y células de reserva que abarcan las partículas de manteca de cacao, los granos de almidón, las proteínas (granos de aleurona) y todas las enzimas (Pazmiño Aldaz, 2005).

Cuando ya está muerto el embrión de la almendra, las paredes celulares hacen capaz de que las células puedan prolongarse libremente a través de los tejidos. Es así como las células de reserva, no coloreadas, se juntan con los polifenoles quienes estaban antes separados. Entre el grupo de polifenoles, los pigmentos antociánicos están hidrolizados en productos no coloreados, que cuando ocurre la oxidación se tornan un color marrón característico del cacao. La disminución de los antocianinos es levemente rápida desaparición de los compuestos fenólicos se da sobre todo a una perdida por ósmosis de los tegumentos de la almendra. En la primera fase de la fermentación se producen una serie de reacciones de hidrólisis que en efecto da paso a una fase aerobia que comienza al final de la fermentación continuando con el proceso de secado. En la fase final, las reacciones de oxidación influyen en los compuestos fenólicos como en los productos de antocianinas. Ya es en esta etapa en donde las almendras toman un color pardo y va perdiendo su astringencia, lo cual es una característica de un cacao bien fermentado, resultado de la insolubilidad de los productos de la oxidación de los polifenoles.

Respecto a los compuestos nitrogenados, se da a lo largo del proceso de fermentación una disminución, debido a la pérdida de teobromina (40% aprox.) y la degradación de las proteínas. Las actividades de las enzimas destruyen a las proteínas, y la formación de ácidos aminados y péptidos se van perdiendo por difusión, de manera lenta resultando grandes cantidades de compuestos nitrogenados cuya proporción va siendo menor mientras más completa es la fermentación (Braudeau J. , 1970).

A continuación, se describen los porcentajes de componentes químicos presentes en la almendra de cacao, manteca de cacao y polvo de cacao, los cuales están señalados en la Tabla N°3, Tabla N°4 y Tabla N°5.

Tabla 3 PORCENTAJES DE COMPUESTOS QUÍMICOS EN EL CACAO

Grano de cacao sin cáscara, fermentado y secado	%
Agua	3,2
Grasa de cacao	57
Cenizas	4,2
Nitrógeno	2,5
Teobromina	1,3
Cafeína	0,7
Almidón	9
Fibra cruda	3,2

Fuente: (Rios, 2016)

Tabla 4 PORCENTAJES DE COMPUESTOS QUÍMICOS EN LA MANTECA DE CACAO

Manteca de Cacao-Composición Química	
Glicéridos	%
Trisaturados	2,5-3,0
Triinsaturados-Tri-oleína	1,00
Di-insaturados	
Estearo-dioleína	6 a 12
Palmito-dioleína	7 a 8
Monoinsaturados	
Oleo-diestearina	18 a 22
Oleo-palmitoestearina	52 a 57
Oleo-dipalmitina	4 a 6

Fuente: (Rios, 2016)

TABLA 5 PORCENTAJES DE COMPUESTOS QUÍMICOS EN EL POLVO DE CACAO

Polvo de cacao-Composición Química	%
Humedad	3
Grasa de cacao	11
pH con suspensión al 10%	5,7
Cenizas	5,5
Cenizas solubles en agua	2,2
Alcalinidad- cenizas de cacao puro, en K ₂ O	0,8
Fosfato (P ₂ O ₅)	1,9
Cloro (NaCl)	0,04
Cenizas insolubles en HCl 50%	0,08
Cáscara, cálculo a partir de granos no alcalinizados sin cáscara	1,4
Total de nitrógeno	4,3
Nitrógeno corregido por alcaloides	3,4
Nitrógeno corregido por alcaloides x 6,25	21,2
Teobromina	2,8

Fuente: (Rios, 2016)

2.6.3 Características de la pulpa como sustrato para la fermentación de cacao

El sustrato para la fermentación del cacao es una pulpa blanca la cual posee 79.7-88.5% de agua, albuminoides 0.5-0.7%, astringentes, 8.3-13.1% de glucosa, sacarosa 0.4-0.9%, almidón, 0.2-0.4%, 0.7%, de ácidos no volátiles (como tartárico), 0.03% Fe₂O₃ y 0.4% de sales minerales (K, Na, Ca, Mg), 0.6% de proteínas y otros componentes con porcentajes menores. (Palma, 2013).

La composición de la pulpa es importante porque a partir de los azúcares y el alto porcentaje de humedad contenidos en ella, se inicia inmediatamente el proceso fermentativo (Orcés & Piedra, 2012) donde las levaduras se desarrollan en primera instancia debido a condiciones óptimas de temperatura (28-35°C) y un pH ácido de 3 a 5, éstas consumen principalmente la glucosa de la pulpa que rodea a los granos de cacao frescos llevándose a cabo las reacciones bioquímicas responsables de que se formen los precursores del sabor a chocolate, produciendo así compuestos ácidos tanto lácticos como acéticos en este punto el ácido se penetra hacia el grano eliminando el germen en condiciones aeróbicas el cual es un indicativo que se ha dado un excelente proceso fermentativo.

TABLA 6 COMPOSICIÓN QUÍMICA DE PULPA DE CACAO (G/100G DE PULPA FRESCA)

Sacarosa	4,35
Glucosa	3,00
Fructosa	3,80
Nitrógeno total	0,11
Aminoácidos libres	0,15
Proteínas/péptidos	0,57
Amonio	0,02

Fuente: (Orcés & Piedra, 2012)

2.7 Factores que influyen en el proceso fermentativo del cacao

Existen diversos factores que influyen en este proceso, entre ellos tenemos: madurez de las mazorcas, almacenamiento de las mazorcas, cantidad de granos, cantidad de pulpa, tipo de cacao, duración de la fermentación y efectos climáticos, no obstante, hay factores aún más importantes entre los cuales tenemos:

- Microorganismos
- Temperatura
- Remoción

Microorganismos: La fermentación se subdivide en tres fases, durante la primera fase actúan las levaduras, en la segunda se desarrollan las bacterias lácticas y en la tercera las bacterias acéticas. Al realizar la extracción los granos de cacao se encuentran estériles, pero son colonizados por una gran variedad de microorganismos (Llerena, 2016), de las manos de los manipuladores, de los insectos, de los recipientes usados para el transporte, etc. En el proceso de fermentación de las semillas del cacao los microorganismos juegan un papel importante.

La intervención de microorganismos son de suma importancia en el proceso fermentativo del cacao ya que dan inicio a una sucesión microbiana: levaduras-bacterias de ácido láctico – acetobacter, dándose así, en las primeras 48 horas la fermentación anaeróbica, donde las levaduras ayudan a metabolizar el azúcar en alcohol, proporcionando así una reacción exotérmica y formando el ácido láctico, seguido, interviene la fermentación aeróbica la cual se da desde el día 3 en adelante, donde a partir de los volteos se genera el crecimiento de bacterias acetobacter transformando así el alcohol en ácido acético, produciéndose nuevamente una reacción exotérmica, aumentando la temperatura y penetrando en el grano para que de esta manera se produzcan cambios que formen iso precursores del sabor a chocolate.

Temperatura: La fermentación debe realizarse en un sitio caliente que favorezca el aumento de la temperatura, lejos del recorrido del viento para evitar que la misma descienda y que las partículas que puedan venir en el viento no contaminen la fermentación garantizando un proceso de fermentación completo y parejo. Para lo cual se puede construir una estructura que proteja al contenedor, de la incidencia directa de los rayos del sol, para evitar que la luz ultravioleta mate a los microorganismos beneficiosos. También se debe evitar que la lluvia llegue a los recipientes fermentadores, dado que la temperatura descendería matando a los microorganismos responsables de los diferentes tipos de fermentación y proporcionaría además humedad innecesaria, ya que la misma es provista por el mucílago de los granos de cacao (Llerena, 2016). Para obtener una buena fermentación en las almendras de cacao, es muy importante que se den los volteos ya que así, la temperatura será homogénea en todas las almendras. Durante los primeros días de fermentación la temperatura no varía en gran medida como el de los últimos días, alcanzando así una temperatura de 50°C, generando compuestos orgánicos los cuales penetraran en el interior del grano, dándose la muerte del embrión y

terminando parcialmente el proceso de fermentación en las almendras de cacao.

Remoción o Volteo: El proceso de volteo tiene el efecto inmediato de enfriamiento, liberación de CO₂ y aumento de la aireación y por consiguiente de la actividad de las bacterias acéticas. El fin de esta actividad es asegurar el grado de fermentación uniforme. El volteo debe empezar a las 48 horas de iniciada la fermentación, luego se lo hará cada 24 horas, es decir, una vez al día durante los 2 o 3 días restantes dependiendo del tipo cacao fermentado, pero siempre a la misma hora. (Llerena, 2016).

2.8 Producción de precursores de aroma durante la fermentación

Durante la fermentación intervienen algunos grupos precursores del aroma característico del cacao entre ellos figura los más importantes: Ácidos Orgánicos, Poli fenoles y Alcaloides (metilxantinas: teobromina y la cafeína).

Según (Armijos, 2002) los ácidos orgánicos juegan un papel muy importante dentro del proceso fermentativo del cacao ya que además de generar la muerte del embrión, estos ácidos mediante reacciones bioquímicas producen reacciones de formación de los precursores del aroma a chocolate. Estos ácidos se dividen en dos grupos volátiles y no volátiles, entre los ácidos volátiles figura el: ácido acético, propiónico, butírico, isobutírico e isovaleriánico y entre los ácidos no volátiles: ácido oxálico, cítrico, málico, succínico, láctico y tartico, citado por (Recalde, 2007) , en el cual durante la fermentación los ácidos volátiles y no volátiles de mayor contenido en el cacao son el ácido acético y el ácido cítrico respectivamente.

Es así que durante la fermentación se forman compuestos precursores del sabor a chocolate los cuales han sido aducidos en evidencias experimentales que indican que el tan importante precursor del aroma del chocolate pertenece a los compuestos polifenólicos (Jolly, 1957) , los cuales son almacenados en las células pigmentarias de los cotiledones y le aportan colores que van desde el blanco hasta un morado oscuro, dependiendo de la cantidad de antocianinas, leucocianidinas (aparecen entre el segundo y tercer día, pero luego desaparecen al combinarse con proteínas), cianidinas (entre el tercero y quinto día de fermentación desaparecen por completo al integrar parte de las reacciones bioquímicas ocurridas), epicatequina y procianidinas almacenadas (Rico, 2015) siendo todos estos los polifenoles más estudiados en el proceso fermentativo ya que desempeñan un papel fundamental en los aspectos de calidad del cacao como: aroma, color y astringencia.

El cacao (*Theobroma cacao* L.), es en particular rico en polifenoles, estos representan entre 12 y 18 % (Bustamante, Tenorio, & Rojano, 2013) del peso seco de los granos, y se encuentran fuertemente asociados con la actividad antioxidante y con las características organolépticas de los productos elaborados a partir del cacao.

En uno de los estudios más recientes, Alorio y colaboradores (2007), encontraron que el tostado es la etapa que tiene mayor influencia sobre el contenido de polifenoles ya que los extractos de almendra fermentadas al tostarse en presencia de la teobromina exhalan un aroma bastante semejante al del chocolate (Jolly, 1957) y también que las sustancias como la clovamida posee actividad antioxidante.

Por otra parte, la reacción de Maillard que se desarrolla durante el tostado es un factor importante para el desarrollo de sabor y aroma a cacao, donde intervienen aminoácidos libres, péptidos y azúcares reductores (Farah, Zaibunnisa, & Misnawi, 2012).

Según (Voigt, 1994) menciona, que los aminoácidos hidrofóbicos leucina, alanina, fenilamina y tirosina producto de la actividad de la proteinasa en la fermentación son principales contribuidores, así como la glucosa y azúcares reductores.

Los aldehídos y pirazinas producen los clásicos aromas a “chocolate”; los compuestos heterocíclicos como la leucina y glucosa generan notas de “chocolate dulce”; la treonina, glutamina y glucosa dan notas de “chocolate” cuando se calienta a 100°C; la valina y la glucosa calentadas a 180°C proporcionan notas como “chocolate penetrante”. Dichas notas indican que las reacciones de Maillard han ido más allá de la etapa final (Dimick & Hoskin, 1999). El pirualdehído y la valina contribuyen al aroma y sabor a nuez. Las pirazinas con los compuestos que encabezan (el 20% de compuestos relacionados con el aroma), ésteres (13%), hidrocarburos (13%) y los ácidos (11%) (Ramli & Hassan, 2006). El compuesto aromático feniactaldehído produce un aroma floral/miel, pero hay otros factores que podrían provocar estos aromas florales durante el tostado. Uno de los compuestos más usuales que generan notas florales es el linalol, presente en muchas flores y frutos, aunque no se conoce exactamente de donde proviene, pero sí que se forma entre la fermentación y antes del tostado (Afoakwa, 2009).

2.9 Microorganismos iniciadores de la fermentación en cacao

Durante la fermentación del cacao se generan diversos microorganismos iniciadores los cuales ayudan a la formación de diversos compuestos indispensables para un buen proceso fermentativo el cual repercute en las propiedades organolépticas del mismo sean estas en su sabor, aroma, etc. Diversos productos son originados en las fermentaciones:

TABLA 7 REACCIONES Y MICROORGANISMOS PRESENTES EN LA FERMENTACIÓN DE CACAO

<p align="center">Fermentación del etanol</p> <p>Glucósidos-----CH₃-CH₂OH+CO₂ + ATP</p> <p>El glicerol se produce también como un producto intermedio de la fermentación alcohólica.</p>	<p>Las levaduras son los convertidores de aldehídos (C₆H₁₂O₆) a alcoholes más eficientes. La levadura del género <i>Saccharomyces</i> es de gran importancia industrial en las fermentaciones alcohólicas y de alimentos (Bailon, 2012).</p> <p>Las cepas que mayormente intervienen en esta fase fermentativa del cacao son: <i>Kloeckera apiculata</i> y <i>Saccharomyces cerevisiae</i> var. <i>Chevalleri</i></p>
<p align="center">Fermentación láctica</p> <p>Glucosa ----- ENERGIA + ACIDO LACTICO (CH₃-CH(OH)-COOH)</p> <p>El ácido láctico es un producto de desecho.</p>	<p>Son de gran importancia en la conservación de alimentos. El azúcar en el producto alimenticio puede ser convertido a ácido láctico y otros productos finales. Las inoculaciones naturales son tales, que en un medio adecuado la bacteria del ácido dominará, por ejemplo, la acidificación de la leche (Bailon, 2012).</p> <p>Las cepas que mayormente intervienen en esta fase fermentativa del cacao son: <i>Lactobacillus fermentum</i> y <i>Lactobacillus plantarum</i>.</p>
<p align="center">Fermentación acética</p> <p>C₂H₅OH + O₂ ----- CH₃-COOH + H₂O</p> <p>La fermentación puede ser oxidativa es decir en presencia de oxígeno, pero es una oxidación aeróbica incompleta, como la producción de ácido acético a partir del etanol.</p>	<p>Resulta de la oxidación del alcohol por la bacteria del vinagre en presencia del oxígeno del aire: Esta bacteria, a diferencia de las levaduras productoras de alcohol, requiere un suministro generoso de oxígeno para su crecimiento y actividad (Bailon, 2012).</p> <p>Las cepas que mayormente intervienen en esta fase fermentativa del cacao son: <i>Acetobacter aceti</i> y <i>Gluconobacter oxydans</i></p>

Fuente: (Llerena & Uriña, 2017)

CAPÍTULO III: DISEÑO METODOLÓGICO

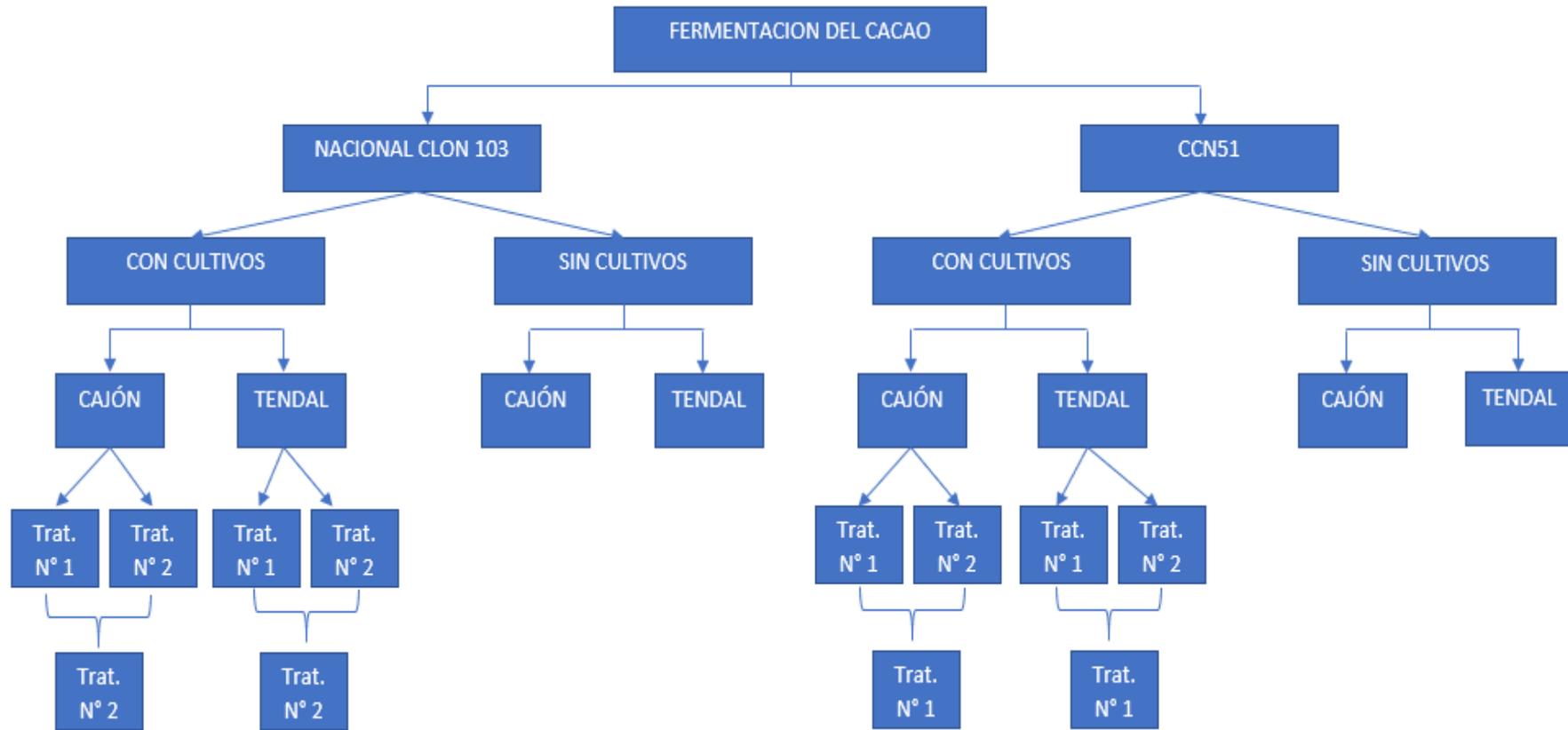
Según el problema formulado y los objetivos planteados el tipo de investigación según (Zapata, 2013) menciona que es descriptivo porque se interpretan sistemáticamente los hechos del fenómeno de estudio y experimental dado que se expone más de un tratamiento con la finalidad de analizar y comparar los resultados. De acuerdo con la naturaleza de los datos, será cualitativo-cuantitativo o mixto porque la medición de las variables se realizará mediante tratamientos y niveles, y será prospectivo porque la información será registrada a medida que ocurra el tiempo.

De acuerdo con el método de procesamiento y análisis estadístico se aplicaron métodos, instrumentos y procedimientos de acuerdo con lo siguiente:

- Análisis de datos obtenidos.
- Asignación de códigos a los tratamientos en estudio.
- Elaboración de la base de datos para el programa SPSS.
- Tabulación.
- Presentación gráfica de los resultados.

Al trabajar con variables cuantitativas se utilizaron pruebas estadísticas de frecuencia de medidas relativas (porcentaje %) y medidas de tendencia central (comparación de medias). En el siguiente Cuadro N° 1 se muestra el diseño experimental a desarrollar de nuestra investigación.

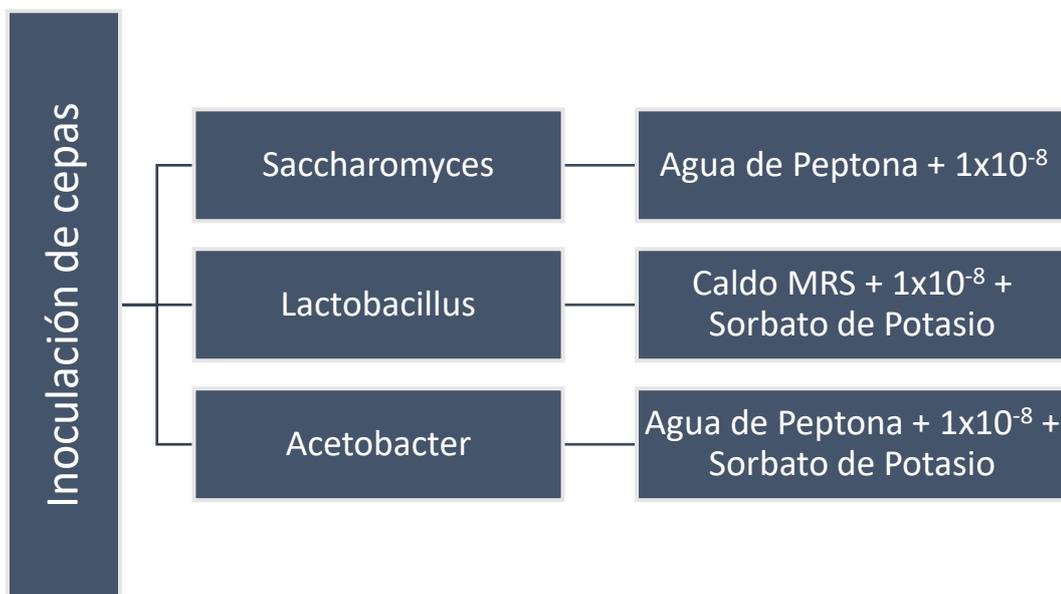
CUADRO 1 DISEÑO EXPERIMENTAL DEL PROCESO



Fuente: Elaborado por las autoras

3.1 Selección de cepas para la fermentación de cacao

CUADRO 2 PREPARACIÓN DE INÓCULOS PARA EL ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO



Fuente: Elaborado por las autoras

3.2 Condiciones óptimas para el desarrollo de los microorganismos iniciadores de la fermentación

Levaduras: es un hongo unicelular, su temperatura óptima de crecimiento varía entre los 22 y 29 °C, mismo que sobrevive a más de 53°C y se almacena a temperaturas de 7°C o menores. Entre todos los microorganismos, las levaduras de la especie *Saccharomyces cerevisiae* son las protagonistas en la fermentación, influyendo significativamente en las características organolépticas del producto final (Zumárraga & Barbero, 2012).

Bacterias lácticas: Son bacterias Gram positiva. Se encuentran comúnmente en el ser humano y otros tractos gastrointestinales de mamíferos, saliva, y varios productos alimenticios. Puede crecer a temperaturas entre 15-45°C y a niveles de pH tan bajos como 3.2. *L* (Morin & Moore, 2010).

Bacterias acéticas: Son unas procariotas Gram negativo que no es patógeno, que convierte el etanol en ácido acético con la presencia de oxígeno, convirtiéndolo en un aerobio obligado. Este microbio es comúnmente conocido por el público como la producción de vinagre, vinos y cervezas (Morin & Moore, 2010). Con respecto a su desarrollo, la temperatura óptima de crecimiento es de 25-30°C y su pH óptimo es de 5-6, aunque crecen bien a pH inferiores a 4 Se suelen encontrar en substratos azucarados y/o con presencia de alcohol como pueden ser zumos de frutas, vino, sidra, cerveza o vinagre.

A continuación, en la siguiente tabla se señala las condiciones de pH y temperatura en que se desarrollan los microorganismos antes mencionado:

TABLA 8 CONDICIONES ÓPTIMAS PARA EL DESARROLLO DE LOS MICROORGANISMOS INICIADORES DE LA FERMENTACIÓN DEL CACAO

MICROORGANISMOS	PH MINIMO	PH MAXIMO	TEMPERATURA MINIMA	TEMPERATURA MAXIMA
Levaduras	3	6	28 °C	55°C
B. lácticas	3 – 3,6	5,4 – 6	15 – 32 °C	45 °C
B. acéticas	4,0 – 4,5	7,8 – 8	25 – 30 °C	40°C

Fuente: Elaboración Propia

3.3 Métodos de fermentación sin y con cultivos iniciadores

La fermentación de las almendras de cacao se llevaron a acabo de dos maneras: la primera, es de forma tradicional en la cual no se aplican cultivos ya que a lo largo de la fermentación, estos microorganismos poco a poco se irán desarrollando hasta que termine la fermentación dependiendo de la variedad de cacao, la segunda es adicionando microorganismos al inicio de la fermentación, tales como: levaduras, bacterias lácticas y bacterias acéticas, analizando diariamente en cada una de ellas diferentes parámetros tales como : físicos, químicos y microbiológicos. Una vez culminado ambas formas de fermentación se determinará, en cuales de estos métodos se obtendrán mejores resultados con respecto al porcentaje de fermentación de las almendras.

3.3.1 Fermentación por el método de cajón y montón sin cultivos iniciadores

Fase experimental:

Investigación de campo.

Universo: Frutos de cacao de la Estación Pichilingue INIAP ubicada Quevedo.

Muestra: dirigida a dos tipos de cacao: uno es el Cacao Nacional (*Theobroma cacao L.*) en base a uno de sus clones liberado hace 2 años el cual es el clon 103 y el otro es el CCN51 o también llamado Cacao de Ramilla el cual también es un híbrido saliente del cacao amazónico y trinitario.

Manejo post-cosecha o beneficio del cacao:

Recolección de la muestra:

- Durante la recolección de los frutos se verificó que los mismos fueran frescos, maduros y sanos para evitar que los resultados fueran afectados, ya que en los frutos inmaduros no se ha terminado de formar el mucílago, siendo este factor necesario para el inicio del proceso de fermentación del cacao, pues en él se encuentran azúcares necesarios para la fermentación de la almendra.
- Se recolectó dos tipos de cacao: Nacional Clon 103, frutos de color amarillo, rugosidad intermedia y de forma ovoide y el CCN51, frutos de color amarillo con rojo, rugosidad intensa y forma ovoide.
- Se recogieron entre 15 a 20 mazorcas de cada tipo, para obtener la cantidad suficiente de semillas de cacao para realizar el proceso de fermentación.

Desgrane: Una vez recolectadas las mazorcas se procedió al desgrane de las mismas.

- Para ello se realizó una abertura longitudinal en cada una de ellas utilizando un machete.

- Una vez abiertas se procedió a sacar todas las almendras de cada tipo de cacao y se las colocó en un balde.
- Seguido se hizo el respectivo pesado, donde el peso estándar que se utilizó para la realización de la fase experimental de este proyecto fue de 1 Kg.

Proceso de Fermentación:

- Una vez pesadas las almendras se procedió a colocar una parte de los dos tipos de cacao sobre una mesa de madera cubiertas con hojas de plátano y la otra parte de los dos tipos de cacao sobre cajones de madera cubiertas con sacos de yute cuya finalidad es de producir calor, a estos métodos se la denomina Montón y Cajón respectivamente, en el cual se efectuaron volteos a intervalos de 48 y 96 horas para el Cacao Tipo Nacional Clon 103, el cual, según (INIAP, 2017) posee un periodo de fermentación de 4 días, así también se harán volteos a intervalos de 48, 96 y 144 horas para el Cacao CCN51, el cual, según (INIAP, 2017) posee un periodo de fermentación de 6 días. No obstante, el periodo de fermentación experimental para ambos genotipos fue de una semana.
- En el proceso fermentativo de cada uno de los métodos se monitoreo pH, acidez titulable, acidez libre, acidez total y el recuento de microorganismos para los cuales se recolecto una muestra de fermento diario entre 15 a 20 almendras aproximadamente, partiendo del día 1 de fermentación hasta el día 7.

Secado

- Una vez concluido el proceso fermentativo tanto del cacao tipo Nacional como el del CCN-51, se procedió al secado de las almendras las cuales tuvieron exposiciones graduales al ambiente, las mismas se colocaron sobre plataformas de madera dentro de una marquesina cuyo objetivo es impedir el ingreso de gallinas, perros, roedores y otros animales, evitando así la contaminación de los granos.
- Para que el proceso sea uniforme, en los primeros días se voltearon las almendras con poca frecuencia y en los días siguientes con mayor frecuencia hasta terminar el proceso de secado y así llegar a un porcentaje de humedad del 6 a 7%.

- Culminado el proceso de secado se procedió a determinar la humedad para tener la certeza que dicho proceso ha llegado a su fin, la cual debe estar entre un rango de 6 a 7 %. Para ello se utilizó un equipo de marca “KPM Aqua – Boy III”, el cual se colocó en el recipiente del determinador de humedad una alícuota de cada tipo de almendra fermentada hasta llegar a la línea de enrase. Se ajustó el adaptador y posteriormente se presionó el botón para determinar el porcentaje de humedad, este proceso se lo realizó 3 veces, es decir se obtuvo 3 tomas de lecturas, las cuales se promediaron para obtener así el dato final con respecto al porcentaje de humedad de la muestra.
- Otra manera de saber que el proceso de secado ha terminado, es mediante el resquebrajamiento o crujido que se siente al apretar un puñado de los granos en las primeras horas de la mañana. Al terminar el secado, en el interior de los granos se forman unas pequeñas estrías dependiendo de cada genotipo ya que en el cacao tipo Nacional sus estrías van formando muchas ramificaciones y en el cacao tipo CCN-51 sus estrías no forman muchas ramificaciones, además del color marrón oscuro típico del cacao bien beneficiado.

Almacenamiento

Por medio de un determinador de humedad marca KPM Aqua – Boy III, el cual solo se utiliza para determinar la humedad de almendras secas, se comprobó que las mismas alcanzaron un porcentaje de humedad de 6 a 7%, las cuales fueron colocadas en sacos de tela suave, y almacenados en la bodega del Laboratorio de Calidad Integral de Cacao, hasta el momento de realizar las pruebas o ensayos de corte y la preparación del licor de cacao para las respectivas evaluaciones sensoriales.

3.3.2 Fermentación por el método de cajón y montón con cultivos iniciadores

Se realizó el aislamiento de 3 microorganismos, los cuales se encuentran muy presente durante la etapa fermentativa de las almendras de cacao.

Aislamientos de cultivos iniciadores

Entre las cepas a aislar tenemos: levaduras, bacterias lácticas y acéticas, las mismas que se aislaron de distintas muestras, entre ellas tenemos que la levadura del género *Saccharomyces* se la aisló de una muestra de levadura activa de grado alimenticio, la bacteria láctica del género

Lactobacillus se la aisló de una muestra de leche de cabra y la bacteria acética del género *Acetobacter* se la aisló a partir de una muestra de vino que anteriormente se lo había destapado al ambiente por una semana.

Partiendo de estas 3 muestras, se llevó a cabo el crecimiento de las cepas utilizando para ello medios de cultivo líquidos, los cuales se los realizó de la siguiente manera: Para el crecimiento de levaduras, se añadió 1 gramo de levadura activa en 9 ml de Agua de Peptona y se lo lleva a agitación por 1 minuto; para el crecimiento de bacterias lácticas, se añadió 1 ml de muestra en 8 ml de Caldo MRS más 1 ml de Sorbato de potasio a una concentración de 200 ppm ya que según ensayos realizados por (Gerard, CARACTERIZACIÓN DE BACTERIAS DEL ÁCIDO ACÉTICO DESTINADAS A LA PRODUCCIÓN DE VINAGRES DE FRUTAS , 2015) comprobó que con el uso de 200 ppm de sorbato de potasio se obtenían resultados favorables en la inhibición de mohos y levaduras por lo cual se optó por añadir este micostático en dicho caldo de enriquecimiento , seguido, se lleva el tubo con la muestra a agitación por 1 minuto; para el crecimiento de bacterias acéticas, se añadió 1 ml de muestra en 8 ml de Agua de Peptona más 1 ml de Sorbato de potasio y se lo lleva a agitación por 1 minuto. Una vez terminado estas inoculaciones en medios líquidos, se los llevó a incubar, utilizando para ello los parámetros descritos en la Tabla N° 10.

Luego, terminado el proceso de incubación, las muestras se inocularon en cajas Petri con sus respectivos medios de enriquecimiento los cuales están descritos en la Tabla N° 10, utilizando para ello una alícuota de 100 micro litros, seguido se estriaron las placas con el asa de vidrio de Digralsky y se incubaron a una temperatura y a un tiempo específico mismo que esta descrito en la Tabla N° 10.

Pasado el período de incubación, se vio que hubo crecimiento de microorganismos por traslape, por lo cual, se tuvo que hacer varias resiembras, para que de esta manera se llegue a obtener colonias más puras.

Determinación de la concentración de cepas: Levadura, Bacterias lácticas y Bacterias acéticas:

Para determinar las concentraciones de las diferentes cepas, se lo efectuó bajo los estándares de turbidez de McFarland el cual se usa como referencia en suspensiones bacteriológicas para saber el número de bacterias por mililitro, o más bien los UFC según una escala que va de 0.5 a 10, misma que está señalada en la Tabla N° 22.

A partir de los estándares de turbidez de McFarland, se obtiene una gráfica, la cual relaciona absorbancia y UFC, de ésta, se obtiene una ecuación, señalada en el Grafico N° 10. Donde Y es la absorbancia y X son los UFC de la muestra.

Es así como, una vez obtenidas las cepas, mayormente puras, se procedieron a inocular las mismas en 24 tubos de ensayo con agua de peptona, ya que se realizó 8 diferentes tratamientos y por cada tratamiento se utilizó las 3 cepas, dichas muestras fueron refrigeradas hasta el momento de ser utilizadas.

Llegado el momento, se midieron las absorbancias de cada muestra por medio de un espectrofotómetro el cual se calibró a 550 nm, teniendo como blanco sólo agua de peptona. Dichas absorbancias se las reemplazó en la ecuación dada por la Escala McFarland, obteniendo así los UFC/ml de las 24 muestras, las cuales se detallan a continuación:

TABLA 9 CONCENTRACIONES (UFC/ML) DE LA LEVADURA: SACCHAROMYCE CEREVISIAE

PRUEBA	METODO DE FERMENTACION	CACAO TIPO	ABSORBANCIA DE LEVADURAS	1*10 ⁸ (UFC/ML) DE LEVADURAS
1	CAJON	NACIONAL	0,233	2,904
2	CAJON	NACIONAL	0,254	3,199
1	TENDAL	NACIONAL	0,225	2,792
2	TENDAL	NACIONAL	0,43	5,667
1	CAJON	CCN-51	0,361	4,699
2	CAJON	CCN-51	0,486	6,453
1	TENDAL	CCN-51	0,252	3,171
2	TENDAL	CCN-51	0,244	3,058

TABLA 10 CONCENTRACIONES (UFC/ML) DE LA BACTERIA LÁCTICA: LACTOBACILLUS PLANTARUM

PRUEBA	METODO DE FERMENTACION	CACAO TIPO	ABSORBANCIA DE BAL	1*10 ⁸ (UFC/ML) DE BAL
1	CAJON	NACIONAL	0,056	0,422
2	CAJON	NACIONAL	0,034	0,113
1	TENDAL	NACIONAL	0,04	0,197
2	TENDAL	NACIONAL	0,029	0,043
1	CAJON	CCN-51	0,032	0,085
2	CAJON	CCN-51	0,062	0,506
1	TENDAL	CCN-51	0,035	0,127
2	TENDAL	CCN-51	0,027	0,015

TABLA 11 CONCENTRACIONES (UFC/ML) DE LA BACTERIA ACÉTICA: ACETOBACTER ACETI

PRUEBA	METODO DE FERMENTACION	CACAO TIPO	ABSORBANCIA DE BAA	1*10 ⁸ (UFC/ML) DE BAA
1	CAJON	NACIONAL	0,054	0,394
2	CAJON	NACIONAL	0,057	0,436
1	TENDAL	NACIONAL	0,059	0,464
2	TENDAL	NACIONAL	0,049	0,323
1	CAJON	CCN-51	0,047	0,295
2	CAJON	CCN-51	0,036	0,141
1	TENDAL	CCN-51	0,046	0,281
2	TENDAL	CCN-51	0,028	0,029

Adición de cepas a las almendras de cacao

Se adicionaron las 3 cepas a cada tratamiento, donde por cada variedad y método de fermentación se hicieron 2 tratamientos, donde en cada uno de ellos se utilizó diferentes concentraciones de levaduras, bacterias lácticas y acéticas.

Las cepas fueron añadidas a las 8 fermentaciones, desde el inicio, tanto las levaduras como las bacterias lácticas y acéticas, empleando el mismo manejo de post cosecha que se les aplicó a las fermentaciones sin cultivos.

Así mismo, diariamente en cada una de las fermentaciones se monitoreó pH, acidez titulable, acidez libre, acidez total y el recuento de microorganismos para los cuales se recolectó una muestra de entre 15 a

20 almendras aproximadamente, partiendo del día 1 de fermentación hasta el día 4, que fue el día donde se logró fermentar las almendras de cacao.

De las 8 fermentaciones que se aplicaron, 4 se obtuvieron mejores resultados, los cuales serán sometidos al ensayo de corte al igual que 4 restantes para así determinar la calidad del grano de cacao beneficiado en las 8 fermentaciones y realizar comparaciones, para de esta manera determinar el coctel de cepas que obtuvo mayores resultados con respecto al mejoramiento de la calidad del cacao.

3.4 Metodología: análisis de la calidad del cacao fermentado

3.4.1 Humedad, pH y acidez titulable, acidez libre, acidez total y acidez volátil

Preparación de la muestra. (INIAP, 2016)

Introducción. - En el laboratorio la preparación de la muestra es de suma importancia para de esta manera obtener resultados analíticos confiables, por lo tanto, se debe seguir procedimientos adecuados, los mismos que dependerán de la naturaleza de las muestras.

Principio del método. - A partir de estos procesos como: descascarillado, molienda y tamizado se obtiene la matriz adecuada, reducida a un tamaño de partícula que asegure homogenización para los respectivos análisis realizados en el laboratorio.

Campo de aplicación. - Este procedimiento se aplica a muestras de almendras, licor y polvo de cacao para el análisis de parámetros físico-químicos.

Descascarillado y molienda (Procedimiento). -

- a) Remover manualmente la cascarilla que protege las almendras de cacao, utilizando un bisturí.
- b) Pesar dichas muestras.
- c) Tomar unas fundas plásticas ziploc previamente rotuladas donde se depositarán muestras de almendras.
- d) Pasar las almendras a un mini molino donde se molera la muestra poco a poco.
- e) Una vez hecho esto se los pasa a unas nuevas fundas plásticas ziploc previamente rotuladas donde se depositarán las muestras de polvo de cacao.

- f) Se los almacenará en un congelador a $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$, en caso de no procesar inmediatamente la muestra.

3.4.1.1 Humedad

Introducción. - Según (INIAP, 2016) nos dice que la calidad del grano de cacao está íntimamente relacionada con el manejo pos-cosecha: Fermentación y Secado, este último se produce a temperaturas superiores a los $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ consolidando la formación del sabor y aroma característico del cacao.

Se realiza un control diario de este análisis físico para evitar la sobre fermentación de las almendras, generadora de malos olores y sabores asegurando un buen almacenamiento del grano para su comercialización.

Campo de aplicación. - este método es aplicable para polvos de almendras de cacao secas, fermentadas, no fermentadas y licor de cacao. El procedimiento y materiales requeridos se detallan en el Cuadro N° 2 del Apéndice.

3.4.1.2 pH y acidez titulable

Introducción. - La calidad del cacao depende en gran medida del grado y tiempo de acidificación de los cotiledones durante el proceso de fermentación, por lo cual se ha determinado que el pH tiene un rol fundamental respecto a un mayor o menor potencial de formación de precursores de aroma.

La presencia de ácidos durante la fermentación es necesaria para producir la muerte del embrión de la almendra, prevenir la germinación, solubilizar los polifenoles y ayuda a evitar la acción nociva de ciertas bacterias que causan sabores indeseables.

La absorción de ácidos por parte del cotiledón de la semilla es esencial para el desarrollo de precursores de aroma y sabor. Después de la fermentación la acidez de los cotiledones se incrementa con la consecuente disminución del pH.

Según (INIAP, 2016) nos dice que para la determinación de la acidez titulable en muestras de almendras de cacao secas, fermentadas y no fermentadas, polvo de cacao y licor de cacao, se lo realiza a partir del extracto obtenido para medir el pH, para ello se valora el punto final de equilibrio al adicionar $\text{NA OH } 0,1\text{ N}$, hasta alcanzar un pH final de 8,3 mediante valoración potencio métrica. Dicha acidez se lo expresa en V (ml) de NA OH que se necesitó para alcanzar dicho pH por gramos de muestra analizada.

Campo de aplicación. - este método se aplica a almendras de cacao secas, fermentadas y no fermentadas, polvo de cacao y licor de cacao. El

procedimiento y materiales requeridos se detallan en el Cuadro N° 3 del Apéndice.

3.4.1.3 Acidez libre y acidez total

Introducción. - La acidez total se define como la suma de los ácidos en estado libre que existen en una solución y que sean valorables, cuando se realiza la neutralización por adición de una disolución alcalina. La determinación de la acidez total se realiza en la práctica en base a una valoración ácido-base, utilizando como reactivo valorante una base fuerte como es el hidróxido sódico (NaOH), para así alcanzar el pH requerido.

Acidez Libre: es la medida de la concentración de hidrogeniones libres su valor depende de la temperatura, la presencia de otros iones en la solución y la concentración.

Campo de aplicación. - este método es aplicable para polvos de almendras de cacao secas, fermentadas, no fermentadas y licor de cacao. El procedimiento y materiales requeridos se detallan en el Cuadro N° 4 del Apéndice.

3.4.3 Determinación del grado de fermentación

La determinación del grado de fermentación de las almendras al final del secado se lo realiza mediante el Ensayo de corte, propuesto por la Norma Técnica Ecuatoriana (NTE INEN 175, 1986) Cacao en grano - Ensayo de corte. Esta norma tiene como objetivo establecer el método para realizar el ensayo de corte en una muestra de cacao en grano.

Ensayo de corte

- Este ensayo se lo realiza a las almendras de cacao una vez que éstas han sufrido el proceso fermentativo, de secado y hayan alcanzado una humedad del 7% tal como se describe en la Norma Técnica Ecuatoriana (NTE INEN 176, 2006) Cacao en grano-Requisitos
- La toma de muestra se realizó bajo la Norma Técnica Ecuatoriana (NTE INEN177, 1995), en la cual se seleccionó 100 almendras al azar de la muestra representativa y se procedió a realizar un corte longitudinal por la parte central de cada una de las 100 almendras, a fin de exponer la máxima superficie de corte de los cotiledones las cuales se examinarán de forma visual las dos mitades de cada almendra mediante la guía expuesta en la Tabla°12.

- Seguido, se apreciaron las características del cacao en grano beneficiado, correspondiente a cada uno procesos de fermentación, para así identificar la calidad del producto tal como se describe en la Norma Técnica Ecuatoriana (NTE INEN 176, 2006) Cacao en grano-Requisitos. Esta norma establece la clasificación y los requisitos de calidad que debe cumplir el cacao en grano beneficiado y los criterios que deben aplicarse para su clasificación.
- Luego, para determinar el grado de fermentación de las almendras de cacao, se aplicaron las siguientes fórmulas, las cuales nos proporcionaron el porcentaje de granos bien fermentados, granos medianamente fermentados, granos violetas, granos pizarra, granos mohosos y granos infestados, mismas que se establecen a continuación:

$$\% \text{ Granos B. Fermentados} = \frac{\# \text{ granos B. fermentados}}{100 \text{ granos}} * 100$$

$$\% \text{ Granos M. Fermentados} = \frac{\# \text{ granos M. fermentados}}{100 \text{ granos}} * 100$$

$$\% \text{ Granos Violetas} = \frac{\# \text{ de granos violetas}}{100 \text{ granos}} * 100$$

$$\% \text{ Granos Pizarrosos} = \frac{\# \text{ de granos pizarra}}{100 \text{ granos}} * 100$$

$$\% \text{ Granos Mohosos} = \frac{\# \text{ de granos mohosos}}{100 \text{ granos}} * 100$$

$$\% \text{ Granos infestados} = \frac{\# \text{ de granos infestados}}{100 \text{ granos}} * 100$$

Fuente: (Bravo & Mingo, 2011).

A continuación, se describen las características que poseen las almendras después del proceso fermentativo, causas de su coloración y efectos que

poseen las almendras de cacao en el chocolate, todo esto, dependiendo de su grado de fermentación las cuales estas señaladas en la Tabla N°12

TABLA 12 CLASIFICACIÓN DE ALMENDRAS DE CACAO POR EL GRADO DE FERMENTACIÓN

Clasificación de las Almendras	Características	Causas	Efecto de las Almendras en el Chocolate
<p>Grano bien Fermentado</p> 	<p>Grano fermentado cuyos cotiledones presentan en su totalidad una coloración marrón o marrón rojiza y estrías de fermentación profunda. Para el tipo CCN51 la coloración variará de marrón a marrón violeta.</p>	<p>Adecuado proceso de fermentación y secado.</p>	<p>-Sabor y aroma bien desarrollado para la elaboración de chocolate.</p> <p>-Baja astringencia, acidez y amargor.</p> <p>-Máxima expresión de sabor arriba cuando se trata del Nacional.</p>
<p>Grano mediamente fermentado</p> 	<p>Grano cuyos cotiledones son ligeramente estriados y presentan un color ligeramente violeta en sus bordes debido al mal manejo durante el beneficiado.</p>	<p>-Insuficiente tiempo de fermentación. -Ubicación de las almendras dentro de la masa fermentativa. -Remociones tardías Baja temperatura.</p>	<p>-Aroma y sabor aceptables las cuales son aprovechables para la fabricación de chocolate.</p> <p>-Astringencia, acidez y amargor más altos que las almendras bien fermentadas.</p>
	<p>Grano cuyos cotiledones presentan un color violeta intenso, debido al mal manejo</p>	<p>Interrupción del proceso de fermentación, el cual impide la</p>	<p>-Astringencia y acidez muy fuerte.</p> <p>-Son pocos recomendables para la</p>

<p>Grano Violeta</p> 	<p>durante el beneficiado.</p>	<p>degradación de la antocianina es cual es un poli fenol que le da el color violeta intenso a los cotiledones</p>	<p>elaboración de chocolate. -No se han desarrollado los precursores de aroma y sabor a cacao en las almendras.</p>
<p>Grano Pizarra</p> 	<p>Es un grano sin fermentar, que al ser cortado longitudinalmente, presenta en su interior un color gris negruzco o verdoso y de aspecto compacto.</p>	<p>-Ausencia de fermentación. -Granos sometidos ha secado rápido.</p>	<p>-Amargor y astringencia en su máxima expresión. -Fuente para la extracción de grasa. -Altamente indeseable para la industria chocolatera.</p>
<p>Grano Mohoso</p> 	<p>Grano que ha sufrido deterioro parcial o total en su estructura interna debido a la acción de hongos, determinado mediante prueba de corte. En su interior se observa una coloración blanquecina y en ocasiones verdosa amarilla por la presencia de los filamentos de los hongos.</p>	<p>-Almendras invadidas por hongos. -Se favorece cuando el contenido de humedad de las almendras supera el 7%.</p>	<p>-Olores y sabores desagradables. -Dan origen a ocratoxinas que son sustancias perjudiciales para la salud. -Fuente para la extracción de grasa</p>

<p>Grano Infestado</p> 	<p>Grano que contiene insectos vivos en cualquiera de sus estados biológicos.</p>	<p>-Presencia de insectos producto de la poca limpieza de las bodegas. -Falta de fumigación. -Cuando se almacena por largos periodos de tiempo.</p>	<p>-Olores y sabores desagradables.</p>
--	---	---	---

Fuente: (INIAP, 2016)

3.4.5 Cuantificación e identificación de cepas durante la fermentación mediante conteo de placa y por macro - microscopia

Medios líquidos utilizados para la cuantificación de microorganismos: bacterias acéticas, bacterias lácticas y levaduras.

Agua de Peptona: Medio usado como diluyente y para enriquecimiento bacteriano a partir de alimentos y otros materiales de interés sanitario, también es un medio de enriquecimiento no selectivo, es utilizado como medio base para la fermentación de hidratos de carbono y está constituido principalmente por peptona de carne y cloruro de sodio.

- Siembra: Por inoculación directa del material en estudio o como diluyente: realizar las diluciones 1:10 y 1:100, dependiendo del uso que se le quiera dar.
- Para su preparación suspender 20,07 gr en un litro de agua destilada, disolver mediante agitación o calentar a ebullición durante uno o dos minutos luego se procede a esterilizar en autoclave por 15 minutos a una temperatura de 121 °C y presión de 15 PSI.
- Incubación: Aeróbica a 35-37 ° C durante 18-24 horas o 3 días.
- Características del medio: color ámbar claro.
- Almacenamiento: medio deshidratado a 10-35 ° C., medio preparado a 2-8 ° C.

Caldo MRS o MRS Broth: El medio de cultivo permite un abundante desarrollo de todas las especies de lactobacilos. La peptona y glucosa constituyen la fuente de nitrógeno, carbono y otros elementos necesarios para el crecimiento bacteriano. El monoleato de sorbitán, magnesio, manganeso y acetato, aportan cofactores y pueden inhibir el desarrollo de algunos microorganismos. El citrato de amonio actúa como agente inhibitorio del crecimiento de bacterias Gram negativas.

- Siembra: Por inoculación directa del material en estudio
- Para su preparación suspender 51 gr en un litro de agua destilada, disolver mediante agitación o calentar a ebullición durante uno o dos minutos luego se proceder a esterilizar en autoclave por 15 minutos a una temperatura de 121 °C y presión de 15 PSI.
- Incubación: En atmósfera aeróbica, a 35-37 ° C hasta 3 días ó a 30 ° C hasta 5 días.
- Características del medio: color amarillo.
- Almacenamiento: medio deshidratado a 2-8 ° C., medio preparado a 2-8 ° C.

Solución de Sorbato de Potasio (Aditivo): es un aditivo que según (Gerard, CARACTERIZACIÓN DE BACTERIAS DEL ÁCIDO ACÉTICO DESTINADAS A LA PRODUCCIÓN DE VINAGRES DE FRUTAS , 2015), en ensayos previos comprobó que con el uso de 200 ppm de sorbato de potasio se obtenían resultados favorables, es decir se lograba la inhibición de mohos y levaduras por el cual se optó en añadir este micostático en caldos donde se desarrollaban las bacterias lácticas y acéticas.

Medios sólidos utilizados para la cuantificación de microorganismos:

Bacterias Acéticas; Medio Manitol: Se trata de un medio altamente selectivo debido a su alta concentración salina. En el medio de cultivo, el extracto de carne y la pluripeptona, constituyen la fuente de carbono, nitrógeno, vitaminas y minerales, el manitol es el hidrato de carbono fermentable, el cloruro de sodio (que se encuentra en alta concentración) es el agente selectivo que inhibe el desarrollo de la flora acompañante, y el rojo fenol es el indicador de pH. Las bacterias que crecen en un medio con alta concentración de sal y fermentan el manitol, producen ácidos, con lo que se modifica el pH del medio y vira el indicador de pH del color rojo al amarillo.

- Siembra: Sembrar en superficie un inóculo denso de la muestra.
- Para su preparación suspender 111 gr en un litro de agua destilada, disolver mediante agitación o calentar a ebullición durante uno o dos minutos luego se procede a esterilizar en autoclave por 15 minutos a una temperatura de 121 °C y presión de 15 PSI.
- Incubación: durante 18-24 horas a 35-37 °C, en aerobiosis. La American Public Health Association (A.P.H.A) recomienda la incubación durante 3 días a 32 °C, en aerobiosis.
- Características del medio: color rojo.
- Almacenamiento: medio deshidratado a 10-35 °C., medio preparado a 2-8 °C.

Bacterias Lácticas; Medio MRS: El medio de cultivo permite un abundante desarrollo de todas las especies de lactobacilos. La peptona y glucosa constituyen la fuente de nitrógeno, carbono y de otros elementos necesarios para el crecimiento bacteriano. El monoleato de sorbitán, magnesio, manganeso y acetato, aportan cofactores y pueden inhibir el desarrollo de algunos microorganismos. El citrato de amonio actúa como agente inhibitorio del crecimiento de bacterias Gram negativas.

- Siembra: Por inoculación directa del material a analizar. Técnica de Pour Plate: sembrar 1 ml de la muestra y agregar aproximadamente 15 ml del medio de cultivo fundido y enfriado a 45-50 °C. Mezclar por rotación, dejar solidificar.
- Para su preparación suspender 64 gr en un litro de agua destilada, disolver mediante agitación o calentar a ebullición durante uno o dos minutos luego se procede a esterilizar en autoclave por 15 minutos a una temperatura de 121 °C y presión de 15 PSI.
- Incubación: En atmósfera aeróbica con 5-10 % CO₂, a 35-37 °C hasta 3 días ó a 30 °C hasta 5 días.
- Características del medio: color amarillo.
- Almacenamiento: medio deshidratado a 2-8°C., medio preparado a 2-8 °C.+

Levaduras; Medio PDA (Agar Papa Dextrosa): El Agar Papa Dextrosa (Potato Dextrose Agar, PDA, por sus siglas en inglés) es un medio de propósito general para levaduras y mohos que puede ser suplementado con ácidos o antibióticos en el cual para fines de esta experimentación se utilizara los discos de oxitetraciclina y así inhibir el crecimiento bacteriano. Es recomendado para uso con métodos de conteo en placa para alimentos, productos lácteos y pruebas realizadas en cosméticos. La base (infusión de papa) nutricionalmente rica, estimula la esporulación de los mohos y la producción de pigmentos en algunos dermatofitos. El Agar Papa Dextrosa está compuesto por Infusión de Papa deshidratada y Dextrosa que fomentan el crecimiento exuberante de los hongos. El agar es adicionado como agente solidificante. Muchos procedimientos estándares usan una cantidad específica de ácido tartárico estéril (10%) para reducir el pH de este medio a $3,5 \pm 0,1$, y así inhibir el crecimiento bacteriano.

- Siembra: Sembrar en superficie un inóculo denso de la muestra.
- Para su preparación suspender 39 gr en un litro de agua destilada, disolver mediante agitación o calentar a ebullición durante uno o dos minutos luego se procede a esterilizar en autoclave por 15 minutos a una temperatura de 121 °C y presión de 15 PSI.
- Incubación: 3-5 días a una temperatura de 25 °C.
- Características del medio: color beige claro.
- Almacenamiento: medio deshidratado a 2-35 ° C., medio preparado a 2-8 ° C.

Recuento de microorganismos

- Para realizar el recuento de microorganismos, se recogieron muestras de fermento recolectadas de los recipientes de Cajón y Tendal las cuales se hicieron cada 24 horas.
- Seguido, se preparó un banco de diluciones seriadas de 10^{-1} 10^{-3} 10^{-5} 10^{-7} 10^{-8} 10^{-9} , con agua estéril como diluyente, con el objetivo de contar placas que contengan de 30 a 300 colonias.
- De la dilución 10^{-8} se tomó 1ml para proceder a la inoculación en medios líquidos: primero en 8 ml de caldo MRS con 1 ml de sorbato de potasio, segundo en 9 ml de agua de peptona y tercero en 8 ml de agua de peptona con 1 ml de sorbato de potasio.

- Una vez realizadas las inoculaciones en medios líquidos se procedió a la incubación, con las condiciones que cada una de ellas necesita para el desarrollo de microorganismos, como se señala en la Tabla N°13

TABLA 13 . MEDIOS LÍQUIDOS DE CULTIVO: TEMPERATURAS Y TIEMPOS DE INCUBACIÓN POR MICROORGANISMO

MICROORGANISMOS	MEDIOS LIQUIDOS	TIEMPO DE INCUBACION	TEMPERATURA DE INCUBACION
LEVADURAS	AGUA DE PEPTONA	3 DIAS	35 - 37 °C
BACTERIAS LACTICAS	CALDO MRS	3 DIAS	35 - 37 °C
BACTERIAS ACETICAS	AGUA DE PEPTONA	3 DIAS	35 - 37 °C

Fuente: (Llerena & Uriña, 2017)

- Se agregó entre 15 – 20 ml de agar fundido específico para cada microorganismo (levaduras, bacterias lácticas y acéticas), luego se lo dejó enfriar por un periodo entre 15 a 20 minutos.
- Pasado este lapso de tiempo, se procedió a la inoculación en placa, para ello se tomó una alícuota de 100 micro litros de cada muestra y se estrío la placa con el asa de vidrio de Digralsky.
- Las placas se incubaron a temperatura y tiempo de incubación específica para cada microorganismo, como se señala en la Tabla N° 14.

TABLA 14 MEDIOS SÓLIDOS DE CULTIVO: TEMPERATURAS Y TIEMPOS DE INCUBACIÓN POR MICROORGANISMO

MICROORGANISMOS	MEDIOS SÓLIDOS	TIEMPO DE INCUBACION	TEMPERATURA DE INCUBACION
LEVADURAS	AGAR PAPA DEXTROSA	3-5 DIAS	25 °C
BACTERIAS LACTICAS	AGAR MRS	3 DIAS	35-37 °C
BACTERIAS ACETICAS	AGAR MANITOL	3 DIAS	32°C

Fuente: (Llerena & Uriña, 2017)

- Posteriormente se realizó el conteo en placa obteniendo los datos en UFC/ml.
- De los datos obtenidos en UFC/ml, se calcula sus logaritmos (log) para realizar las gráficas de crecimientos de microorganismos.

Nota: Cabe recalcar que todo este procedimiento se lo realizó en condiciones asépticas es por ello que se utilizaron todas las herramientas e instrumentarias necesarias para lograrlo. Es así que, para fines de asepsia, se utilizó una cámara de flujo laminar durante todo el proceso de recuento e identificación de microorganismo.

Identificación de microorganismos

La identificación se realizó para cada una de las bacterias en estudio (levaduras, acéticas y lácticas) recalcando que se identificó el género a que pertenece el microorganismo mas no la especie.

✓ Identificación macroscópica de microorganismos según su morfología

Se observaron colonias en las placas de Petri, después del tiempo de incubación, para cada uno de los medios utilizados. Luego se observó la morfología que poseía cada una de ellas para de esta manera tener colonias características a la de la Tabla N° 15.

TABLA 15 MICROORGANISMOS Y MORFOLOGÍAS DE SUS COLONIAS

MICROORGANISMOS	MORFOLOGIA DE COLONIAS
LEVADURAS	COLONIAS HUMEDAS, CREMOSAS O PASTOSAS
BACTERIAS LÁCTICAS	COLONIAS PEQUEÑAS, BLANCAS-GRISACEAS, LISAS O RUGOSAS
BACTERIAS ACÉTICAS	COLONIAS CIRCULARES BLANCO OPALESCENTE

Fuente: (Morales, 2015)

✓ Identificación microscópica de microorganismos según su morfología

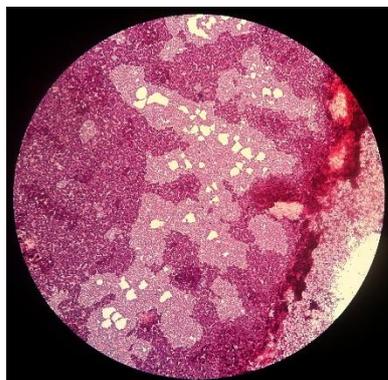
Se procedió a realizar pruebas morfológicas preliminares para la identificación de cepas como lo son la Tinción de Gram y la prueba de catalasa, las cuales se mencionan detalladamente en el Cuadro N° 5 del Apéndice.

GÉNERO: LEVADURAS

GRAM (+) COLOR MORADO

PRUEBA BIOQUÍMICA DE IDENTIFICACION: Tinción de Gram (+) y prueba de catalasa (-)

FOTOGRAFÍA 1 REPRESENTA LAS FOTOGRAFÍAS MICROSCÓPICAS DE LEVADURAS



Fuente: (Llerena & Uriña, 2017)

MEDIO DE CULTIVO PARA RECuento DE COLONIAS: *Agar Potato Dextrosa*

FOTOGRAFÍA 2 REPRESENTA LAS COLONIAS DE HONGOS Y LEVADURAS, PRESENTES EN EL PROCESO DE FERMENTACIÓN INCUBADAS POR EL MEDIO PDA AGAR



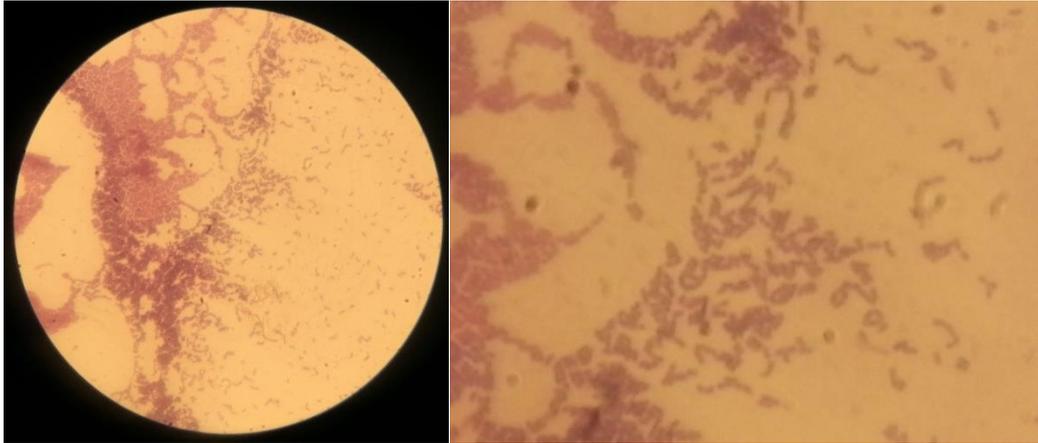
Fuente: (Llerena & Uriña, 2017)

GÉNERO: BACTERIAS LÁCTICAS

GRAM (+) COLOR MORADO

PRUEBA BIOQUÍMICA DE IDENTIFICACION: Tinción de Gram (+) y prueba de catalasa (-)

FOTOGRAFÍA 3 REPRESENTA LAS FOTOGRAFÍAS MICROSCÓPICAS DE LACTOBACILOS GRAM POSITIVOS, INVOLUCRADOS EN EL PROCESO DE FERMENTACIÓN



Fuente: (Llerena & Uriña, 2017)

MEDIO DE CULTIVO PARA RECUENTO DE COLONIAS: *MRS (Man, Rogosa y Sharpe)*

FOTOGRAFÍA 4 REPRESENTA COLONIAS DE BACTERIAS ÁCIDO-LÁCTICAS, PRESENTES EN EL PROCESO DE FERMENTACIÓN INCUBADAS EN MEDIO MRS



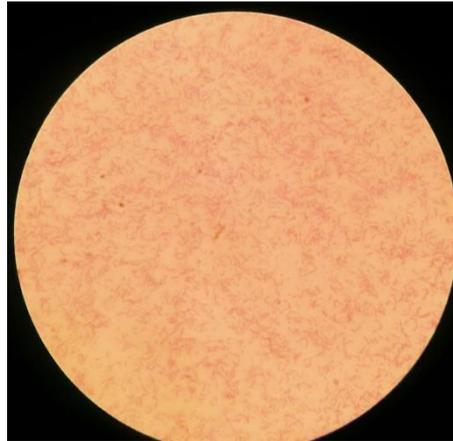
Fuente: (Llerena & Uriña, 2017)

GÉNERO: BACTERIAS ACÉTICAS

GRAM (-) COLOR ROSA O ROJO

PRUEBA BIOQUÍMICA DE IDENTIFICACION: Tinción de Gram (-) y prueba de catalasa (+).

FOTOGRAFÍA 5 REPRESENTA FOTOGRAFÍAS MICROSCÓPICA DE BACTERIAS ACÉTICAS, GRAM NEGATIVAS, INVOLUCRADAS EN EL PROCESO DE FERMENTACIÓN



Fuente: (Llerena & Uriña, 2017)

MEDIO DE CULTIVO PARA RECuento DE COLONIAS: GYC (Carbonato-Extracto de Levadura-Glucosa), DMS_m (Desoxicolato-Manitol-Sorbitol) ó RAE (Medio reforzado con Ácido Acético).

FOTOGRAFÍA 6 REPRESENTA COLONIAS DE BACTERIAS ACIDO ACÉTICAS, PRESENTES EN EL PROCESO DE FERMENTACIÓN, INCUBADAS EN MEDIO MANITOL



Fuente: (Llerena & Uriña, 2017)

Se realizó comparaciones de media estadísticas entre cuatro grupos: con y sin cultivos por el método de Cajón; y, con y sin cultivos por el método de Tendal o Montón con el fin de analizar profundamente los resultados para lograr una conclusión general. Dichos resultados se observan a continuación en las Tablas N° 16, 17, 18 y 19.

TABLA 16 COMPARACIÓN DE MEDIAS EN LA FERMENTACIÓN CON CULTIVOS POR EL MÉTODO DE CAJÓN

Variedades de cacao		BF	M	P	V	MF
Nacional	Media	10,00	15,00	,00	,00	75,00
Trat. # 2	% de suma total	100,0%	50,0%	0,0%	.	64,7%
CCN51	Media	,00	15,00	44,00	,00	41,00
Trat. # 1	% de suma total	0,0%	50,0%	100,0%	.	35,3%
Total	Media	5,00	15,00	22,00	,00	58,00
	% de suma total	100,0%	100,0%	100,0%	.	100,0%

Fuente: Elaborado por las autoras (IBM SPSS Statistics Visor 24).

Para este primer análisis con cultivos por el método de Cajón, podemos observar que el mejor tratamiento fue la variedad Nacional quien presentó los valores más altos respecto al grado de fermentación “BF” almendras bien fermentadas y “MF” almendras medianamente fermentadas.

TABLA 17 COMPARACIÓN DE MEDIAS EN LA FERMENTACIÓN SIN CULTIVOS POR EL MÉTODO DE CAJÓN

Variedades de cacao		BF	M	P	V	MF
Nacional	Media	2,00	,00	8,00	34,00	56,00
	% de suma total	16,7%	.	100,0%	91,9%	39,2%
CCN51	Media	10,00	,00	,00	3,00	87,00
	% de suma total	83,3%	.	0,0%	8,1%	60,8%
Total	Media	6,00	,00	4,00	18,50	71,50
	% de suma total	100,0%	.	100,0%	100,0%	100,0%

Fuente: Elaborado por las autoras (IBM SPSS Statistics Visor 24).

En este segundo análisis tenemos que, sin cultivos por el método de Cajón, la variedad CCN51 fue la que mejor fermentó observándose un total de 10% almendras bien fermentadas y el 87% de almendras medianamente fermentadas.

TABLA 18 COMPARACIÓN DE MEDIAS EN LA FERMENTACIÓN CON CULTIVOS POR EL MÉTODO DE TENDAL O MONTÓN

Variedades de cacao		BF	MF	V	P	M
Nacional	Media	12,00	71,00	,00	17,00	,00
Trat. # 2	% de suma total	100,0%	51,4%	0,0%	47,2%	.
CCN51	Media	,00	67,00	14,00	19,00	,00
Trat. # 1	% de suma total	0,0%	48,6%	100,0%	52,8%	.
Total	Media	6,00	69,00	7,00	18,00	,00
	% de suma total	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%	.

Fuente: Elaborado por las autoras (IBM SPSS Statistics Visor 24).

Para el tercer análisis, con cultivos por el método de Tendal o Montón podemos observar que no hubo mucha diferencia en cuanto al porcentaje de 71% de almendras medianamente fermentadas para la variedad Nacional y el 67% correspondiente para la variedad CCN51, considerándose una buena fermentación entre ambas variedades.

TABLA 19 COMPARACIÓN DE MEDIAS EN LA FERMENTACIÓN SIN CULTIVOS POR EL MÉTODO DE TENDAL O MONTÓN

Variedades de cacao		BF	MF	V	P	M
Nacional	Media	4,00	46,00	,00	,00	50,00
	% de suma total	44,4%	45,5%	0,0%	0,0%	100,0%
CCN51	Media	5,00	55,00	35,00	5,00	,00
	% de suma total	55,6%	54,5%	100,0%	100,0%	0,0%
Total	Media	4,50	50,50	17,50	2,50	25,00
	% de suma total	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%

Fuente: Elaborado por las autoras (IBM SPSS Statistics Visor 24).

En este último análisis, sin cultivos por el método de Tendal o Montón, ocurre casi lo mismo que la Tabla N° 18, no hubo mucha variación entre los porcentajes de fermentación en ambas variedades, presentando una diferencia del 10%.

Entonces tras estos análisis podemos comprobar que el mejor método de fermentación sin y con cultivos independientemente de la variedad corresponde al método de Cajón presentando almendras mayormente fermentadas. Por otro lado, cabe recalcar que los porcentajes mejoraron

con el uso de cultivos iniciadores para la variedad nacional como se muestra en las Tablas N°16, 18 y con la variedad CCN51 por el método de Cajón sin cultivos. Desde el punto de vista de las pruebas sin cultivos el mejor porcentaje de fermentación se presentó en la variedad CCN51 por el método de Cajón como se observa en la Tabla N° 17.

Seguido, se detallan desde la Tabla N° 21 hasta la 28 los resultados fisicoquímicos que se tabularon a diario durante el proceso de fermentación, para las variedades Nacional 103 y CCN51 por el método de Cajón y Tendal.

Análisis de Resultados de los Parámetros Fisicoquímicos, de la Fermentación del Cacao Tipo Nacional Clon 103 por el Método de Cajón Sin cultivos y Con cultivos:

TABLA 20 ANÁLISIS FISICOQUÍMICO DEL CACAO TIPO NACIONAL CLON 103 FERMENTADO POR EL MÉTODO DE CAJÓN SIN CULTIVOS

METODO DE FERMENTACION	CACAO TIPO	DIAS DE FERMENTACION	HUMEDAD	ACIDEZ LIBRE	ACIDEZ TOTAL	PH	ACIDEZ TITULABLE
CAJON	NACIONAL CLON 103	0	0	0	0	0	0
		1	29,33	0,4	0,692	6,59	0,2
		2	29,06	0,7	1,211	5,94	0,22
		3	28,78	0,74	1,279	6,04	0,22
		4	27,54	1,1	1,902	5,88	0,3
		7	13,03	1,22	2,1	5,78	0,8

TABLA 21 ANÁLISIS FISICOQUÍMICO DEL CACAO TIPO NACIONAL CLON 103 FERMENTADO POR EL MÉTODO DE CAJÓN CON CULTIVOS

TRATAMIENTO	METODO DE FERMENTACION	CACAO TIPO	DIAS DE FERMENTACION	HUMEDAD	ACIDEZ LIBRE	ACIDEZ TOTAL	PH	ACIDEZ TITULABLE
2	CAJON	NACIONAL CLON 103	0	0	0	0	0	0
			1	30	0,3	0,518	6,46	0,1
			2	28,33	0,32	0,553	6,44	0,14
			3	26,32	0,44	0,76	6,04	0,2
			4	17	0,46	0,7955	5,42	0,22

Analizando los resultados de los parámetros fisicoquímicos de ambos tratamientos, se puede señalar como semejanza, que la humedad va disminuyendo y todos los tipos de acidez consecuentemente van aumentando.

Como diferencia entre ambos tratamientos, se encuentra el tiempo en que llega fermentarse la almendra de cacao, el cual se lo evaluó a partir del pH, donde el tratamiento sin cultivos logro fermentarse al día 7 a diferencia del tratamiento con cultivos que logro fermentarse al día 4, llegando a un pH de 5,78 y 5,42 respectivamente.

Análisis de Resultados de los Parámetros Fisicoquímicos de la Fermentación del Cacao Tipo Nacional Clon 103 por el Método de Tendal o Montón Sin cultivos y Con cultivos:

TABLA 22 ANÁLISIS FISICOQUÍMICO DEL CACAO TIPO NACIONAL CLON 103 FERMENTADO POR EL MÉTODO DE TENDAL O MONTÓN SIN CULTIVOS

METODO DE FERMENTACION	CACAO TIPO	DIAS DE FERMENTACION	HUMEDAD	ACIDEZ LIBRE	ACIDEZ TOTAL	PH	ACIDEZ TITULABLE
TENDAL O MONTON	NACIONAL CLON 103	0	0	0	0	0	0
		1	29,16	0,72	1,245	6,51	0,2
		2	25,76	0,58	1,003	6,21	0,22
		3	23,62	0,68	1,176	6,4	0,22
		4	16,21	0,92	1,591	5,69	0,4
		7	10,4	1,22	2,1	6,08	0,96

TABLA 23 ANÁLISIS FISICOQUÍMICO DEL CACAO TIPO NACIONAL CLON 103 FERMENTADO POR EL MÉTODO DE TENDAL O MONTÓN CON CULTIV

TRATAMIENTO	METODO DE FERMENTACION	CACAO TIPO	DIAS DE FERMENTACION	HUMEDAD	ACIDEZ LIBRE	ACIDEZ TOTAL	PH	ACIDEZ TITULABLE
2	TENDAL	NACIONAL 103	0	0	0	0	0	0
			1	35	0,3	0,518	6,57	0,12
			2	29,82	0,34	0,588	6,3	0,12
			3	24,57	0,44	0,76	6,04	0,22
			4	16,44	1,1	1,9	5,47	0,5

Examinando los resultados emanados por los dos tratamientos aplicados al genotipo Nacional Clon 103, con respecto a los parámetros fisicoquímicos como se muestra en las Tablas N° 22 y 23, se puede señalar como similitud que la acidez se encuentra en total ascenso mientras que la humedad en total descenso esto se debe a que ambos parámetros son inversamente proporcionales.

Una diferencia entre ambos tratamientos es el tiempo de fermentación de las almendras de cacao, el cual fue evaluado a partir del pH, donde el tratamiento sin cultivos logro fermentarse al séptimo día a diferencia del tratamiento con cultivos que logro fermentarse al cuarto día, llegando a un pH de 6,08 y 5,47 respectivamente.

Análisis de Resultados de los Parámetros Fisicoquímicos de la Fermentación del Cacao Tipo CCN-51 por el Método de Cajón Sin cultivos y Con cultivos:

TABLA 24 ANÁLISIS FISICOQUÍMICO DEL CACAO TIPO CCN-51 FERMENTADO POR EL MÉTODO DE CAJÓN SIN CULTIVOS

METODO DE FERMENTACION	CACAO TIPO	DIAS DE FERMENTACION	HUMEDAD	ACIDEZ LIBRE	ACIDEZ TOTAL	PH	ACIDEZ TITULABLE
CAJON	CCN-51	0	0	0	0	0	0
		1	32,94	0,56	0,9685	6,55	0,2
		2	27,38	0,64	1,107	5,94	0,22
		3	26,51	0,76	1,314	6,15	0,3
		4	24,38	1,36	2,352	5,06	0,4
		7	21,34	2,02	3,494	5,37	0,8

TABLA 25 ANÁLISIS FISICOQUÍMICO DEL CACAO TIPO CCN-51 FERMENTADO POR EL MÉTODO DE CAJÓN CON CULTIVOS

TRATAMIENTO	METODO DE FERMENTACION	CACAO TIPO	DIAS DE FERMENTACION	HUMEDAD	ACIDEZ LIBRE	ACIDEZ TOTAL	PH	ACIDEZ TITULABLE
1	CAJON	CCN-51	0	0	0	0	0	0
			1	30	0,14	0,242	6,62	0,06
			2	26,65	0,32	0,553	6,54	0,08
			3	24,2	0,34	0,588	6,49	0,14
			4	16,21	0,42	0,726	5,51	0,2

Observando los resultados de los dos tratamientos aplicado al genotipo CCN-51, los mismos que están señalados en las Tablas N° 24 y 25, se puede divisar como diferencia entre ambos tratamientos, el tiempo de fermentación, el cual se lo evaluó a partir del pH, es así como al tratamiento aplicado a la fermentación sin cultivos alcanzó a fermentarse al día 7 obteniendo un pH de 5,37 a diferencia del tratamiento con cultivos que logró su fermentación al día 4 alcanzando un pH de 5,51.

Como una semejanza entre ambos tratamientos se encontró que la acidez tanto libre, total y titulable iba creciendo diariamente, mientras que la humedad iba decreciendo ya que dichos parámetros son contrariamente proporcionales.

Análisis de Resultados de los Parámetros Físicoquímicos de la Fermentación del Cacao Tipo CCN-51 por el Método de Tendal o Montón Sin cultivos y Con cultivos:

TABLA 26 ANÁLISIS FÍSICOQUÍMICO DEL CACAO TIPO CCN-51 FERMENTADO POR EL MÉTODO DE TENDAL O MONTÓN SIN CULTIVOS

METODO DE FERMENTACION	CACAO TIPO	DIAS DE FERMENTACION	HUMEDAD	ACIDEZ LIBRE	ACIDEZ TOTAL	PH	ACIDEZ TITULABLE
TENDAL O MONTON	CCN-51	0	0	0	0	0	0
		1	26,89	0,56	0,9685	6,54	0,2
		2	26,14	0,6	1,038	6,17	0,26
		3	24,32	1,12	1,937	5,7	0,3
		4	16,4	1,12	1,937	5,32	0,44
		7	11,42	3,42	5,914	5,46	1,2

TABLA 27 ANÁLISIS FÍSICOQUÍMICO DEL CACAO TIPO CCN-51 FERMENTADO POR EL MÉTODO DE TENDAL O MONTÓN CON CULTIVOS

TRATAMIENTO	METODO DE FERMENTACION	CACAO TIPO	DIAS DE FERMENTACION	HUMEDAD	ACIDEZ LIBRE	ACIDEZ TOTAL	PH	ACIDEZ TITULABLE
1	TENDAL	CCN-51	0	0	0	0	0	0
			1	25	0,2	0,34	6,65	0,14
			2	23,2	0,3	0,5188	6,46	0,16
			3	20,12	0,3	0,5188	6,49	0,24
			4	17,56	0,4	0,6918	5,41	0,42

Comparando los resultados obtenidos de ambos tratamientos los cuales están descritos en las Tablas N° 26 y 27, se deduce lo siguiente:

La humedad disminuye consecutivamente.

La acidez total, libre y titulable aumenta consecuentemente.

El tiempo en que llega fermentarse la almendra de cacao mismo que fue evaluado a través del pH.

El tratamiento sin cultivos logro fermentarse al día 7 a diferencia del tratamiento con cultivos que logro fermentarse al día 4, llegando a un pH de 5,46 y 5,41 respectivamente.

GRÁFICAS DE FERMENTACIÓN SIN CULTIVOS

GRÁFICO 5 RECUENTO DE MICROORGANISMOS (LOG UFC/G) DE LEVADURAS EN LA FERMENTACIÓN DE SIN CULTIVOS

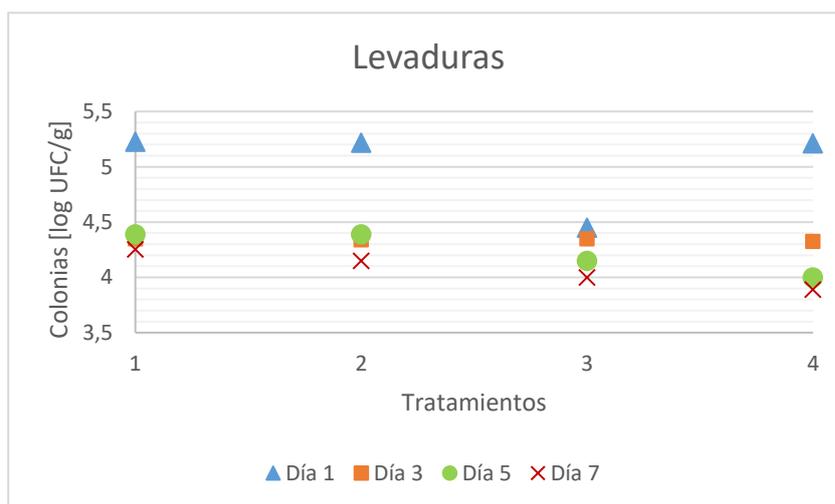


GRÁFICO 6 RECUENTO DE MICROORGANISMOS (LOG UFC/G) DE BACTERIAS ACÉTICAS EN LA FERMENTACIÓN DE SIN CULTIVOS

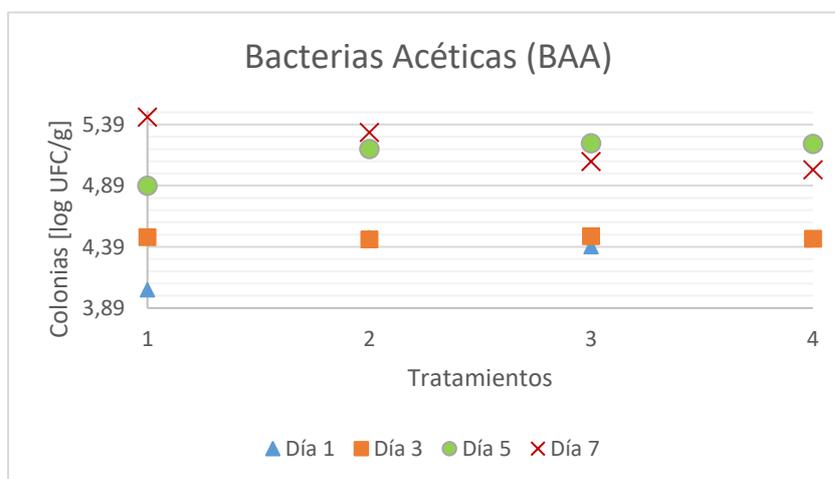
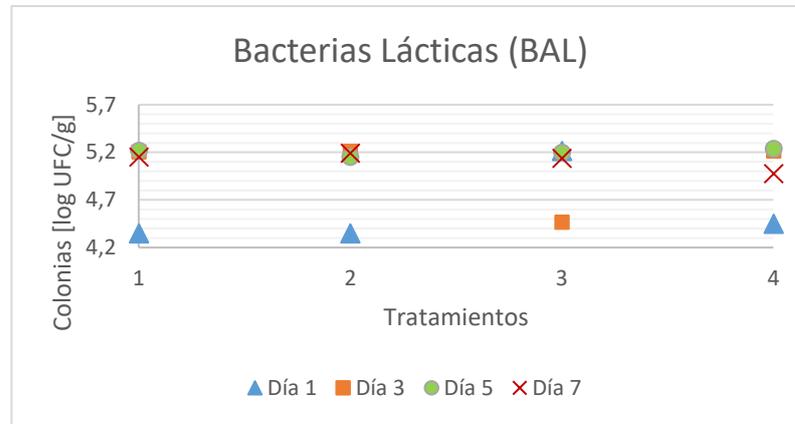


GRÁFICO 7 RECUESTO DE MICROORGANISMOS (LOG UFC/G) DE BACTERIAS LÁCTICAS EN LA FERMENTACIÓN DE SIN CULTIVOS



Los valores del crecimiento microbiano durante los días 1, 2, 3 y 4 se mostraron aproximadamente dentro de un rango de 4 y 5,3 expresado en log UFC/g como se observa en los Gráficos N° 5, 6 y 7 lo cual indica resultados promedios de estudios desarrollados con la fermentación del cacao. En cambio, no sucedió lo mismo con los gráficos de la dinámica de microorganismos que se observan en los Gráficos N° 8, 9 y 10 en el cual se adicionó cultivos iniciadores, el crecimiento de las bacterias lácticas y acéticas aumentó a medida que aumentaban los días y disminuían a su vez las levaduras. Esto condujo a que el tiempo de fermentación disminuyera debido a que pH, llegó a un rango óptimo de 5,4 en el día 4, mientras que en la fermentación sin cultivos llegó en el día 7. Los valores de crecimiento se encontraban mayoritariamente entre 5,0 y 5,2 expresado en log UFC/g.

GRÁFICAS DE FERMENTACIÓN CON CULTIVOS

GRÁFICO 8 RECUENTO DE LEVADURAS (LOG UFC/G) DEL DÍA 1 AL DÍA 7

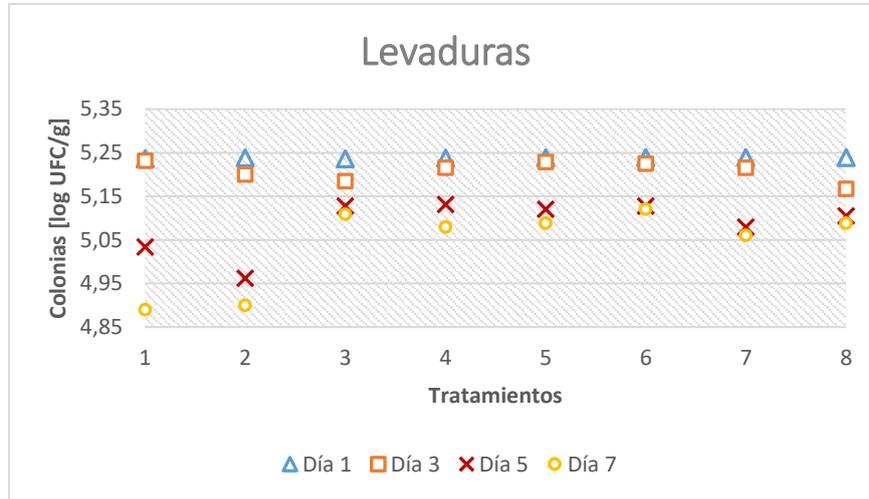


GRÁFICO 9 RECUENTO DE BACTERIAS LÁCTICAS (LOG UFC/G) DEL DÍA 1 AL DÍA 7

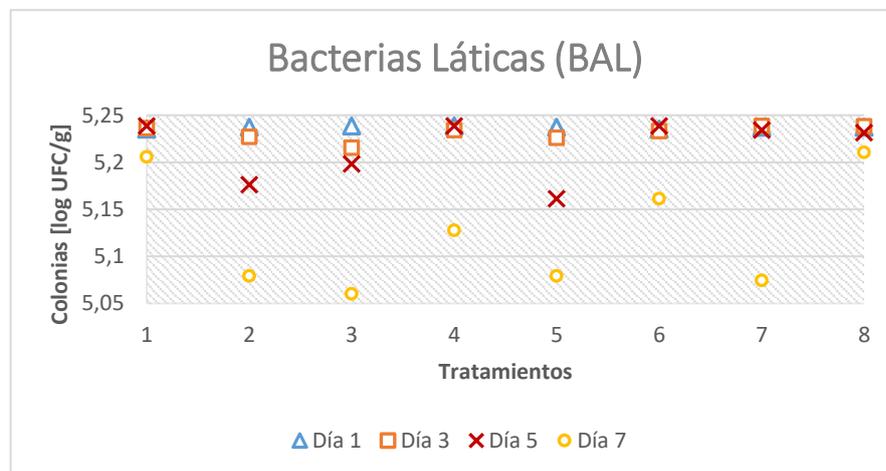
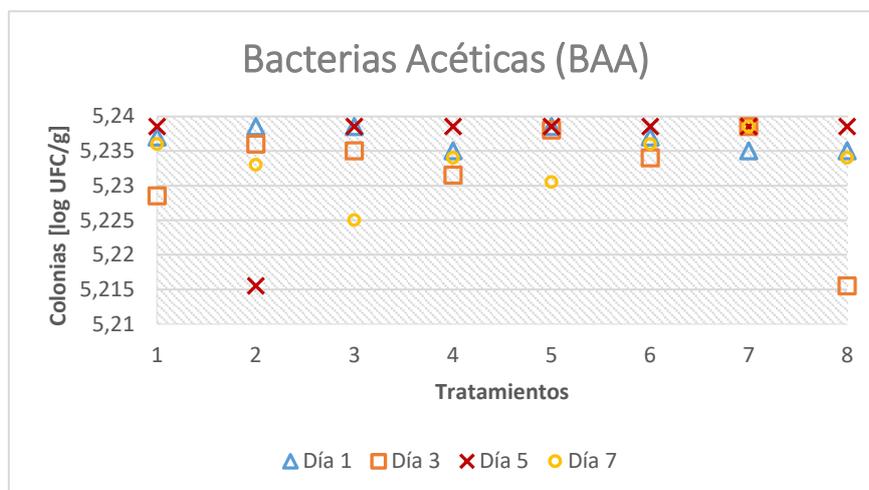


GRÁFICO 10 RECUESTO DE BACTERIAS ACÉTICAS (LOG UFC/G) DEL DÍA 1 AL DÍA 7



4.2 Tiempo y Calidad de la Fermentación

Según los resultados de los análisis físicos químicos realizados a las dos fermentaciones (Sin y Con Cultivos); el tiempo se acortó para la fermentación que fue inducida por microorganismos debido a que 4 de los 8 tratamientos presentaron un pH entre 5,1 - 5,4 el cual se dio en el Día 4, ya que según lo citado por (Armijos, 2002) el pH óptimo de un cacao de calidad debe encontrarse en un rango de 5,1 a 5,4, lo que indicaba que la fermentación de las almendras había finalizado; mientras que en la fermentación tradicional el pH al día 4 aún no llegaba a ese valor, sino que fue hasta el Día 7 que se pudo llegar a dicho pH. Para ambas variedades tanto Nacional Clon 103 como CCN51 se dejó fermentar 7 días, ya que debido a la poca cantidad de almendras el proceso fue mucho más lento.

En cuanto al porcentaje de granos fermentados si aumentó con el uso de cultivos iniciadores, pero el proceso no fue totalmente satisfactorio ya que se presentaron también valores significativos de porcentaje de granos violetas y pizarrosos, es decir que aún les faltaba por fermentar.

Cabe recalcar que los factores que pudieron afectar a nuestro proceso fue la metodología de fermentación usada para una experimentación a pequeña escala y las condiciones climáticas que se presentaron no fueron del todo favorecedoras, lo cual impidió un adecuado proceso de fermentación.

4.3 Comparación del Uso de Cultivos Iniciadores en la Fermentación del cacao tanto por el Método Cajón como el de Montón o Tendal

Una vez culminado el proceso de fermentación, los cuales se los realizó por el método de Cajón y por el método de Tendal con la intervención de cultivos iniciadores, se establecieron las siguientes comparaciones:

En relación a la variedad de cacao Tipo Nacional Clon 103 con el tratamiento dos , aplicado a la fermentación del genotipo Nacional Clon 103 por el método de cajón como se muestra en la Tabla N° 16 se logró obtener un porcentaje de granos mediamente fermentados del 75% añadiendo las siguientes concentraciones de cepas: levaduras $3,199 \cdot 10^8$ UFC/ml , bacterias lácticas : $0,114 \cdot 10^8$ UFC/ml y bacterias acéticas: $0,436 \cdot 10^8$ UFC/ml, mientras que, con el tratamiento dos , aplicado a la fermentación del genotipo Nacional Clon 103 por el método de montón o tendal como se observa en la Tabla N° 18 se logró obtener un porcentaje de granos mediamente fermentados del 71% añadiendo las siguientes concentraciones de cepas: levaduras $5,668 \cdot 10^8$ UFC/ml , bacterias lácticas : $0,043 \cdot 10^8$ UFC/ml y bacterias acéticas: $0,324 \cdot 10^8$ UFC/ml.

Con respecto a la variedad CCN-51 , el tratamiento uno , aplicado al método de cajón , el cual se detalla en la Tabla N° 16 , logró obtener un porcentaje de granos mediamente fermentados del 41% añadiendo las siguientes concentraciones de cepas: levaduras $4,699 \cdot 10^8$ UFC/ml , bacterias lácticas : $0,085 \cdot 10^8$ UFC/ml y bacterias acéticas: $0,296 \cdot 10^8$ UFC/ml mientras que, con el tratamiento uno, aplicado a la fermentación del genotipo CCN-51 por el método de montón o tendal , el cual se muestra en la Tabla N° 18 , se logró obtener un porcentaje de granos mediamente fermentados del 67% añadiendo las siguientes concentraciones de cepas: levaduras $3,171 \cdot 10^8$ UFC/ml , bacterias lácticas : $0,128 \cdot 10^8$ UFC/ml y bacterias acéticas: $0,282 \cdot 10^8$ UFC/ml.

4.4 Costos de Producción de la Utilización de Cultivos Iniciadoras en el Cacao.

Los costos de producción generados en la fermentación de las almendras de cacao con cultivos iniciadores, se encuentran detallados en la Tabla N° 42 del Apéndice, la cual describe la cantidad, el costo por unidad y el costo total de cada insumo, utilizado en la fase experimental del presente proyecto de titulación.

CAPÍTULO V: CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1 Conclusiones

- El genotipo Nacional Clon 103 fermentado por el método de Cajón y por el método de Montones, tuvo mejores resultados aplicando el tratamiento dos, añadiendo las siguientes poblaciones microbianas, para el método de Cajón: levaduras $3,199 \cdot 10^8$ UFC/ml, bacterias lácticas: $0,114 \cdot 10^8$ UFC/ml y bacterias acéticas: $0,436 \cdot 10^8$ UFC/ml y para el método de Montones: levaduras $5,668 \cdot 10^8$ UFC/ml, bacterias lácticas: $0,043 \cdot 10^8$ UFC/ml y bacterias acéticas: $0,324 \cdot 10^8$ UFC/ml.

- El genotipo CCN-51 fermentado por el método de Cajón y por el método de Montones, tuvo mejores resultados aplicando el tratamiento uno, añadiendo las siguientes poblaciones microbianas, para el método de Cajón: levaduras $4,699 \cdot 10^8$ UFC/ml, bacterias lácticas: $0,085 \cdot 10^8$ UFC/ml y bacterias acéticas: $0,296 \cdot 10^8$ UFC/ml y para el método de Montones: levaduras $3,171 \cdot 10^8$ UFC/ml, bacterias lácticas: $0,128 \cdot 10^8$ UFC/ml y bacterias acéticas: $0,282 \cdot 10^8$ UFC/ml.

- El tiempo del proceso fermentativo de las almendras de cacao fue mucho más corto, concluyendo a los 4 días para ambas variedades con la adición de cultivos a diferencia de la fermentación tradicional que duró 7 días tanto para el CCN51 como el Nacional Clon 103.

- Los análisis fisicoquímicos fueron examinados tanto en las fermentación con cultivos y sin cultivos, entre ellos tenemos humedad, acidez y pH ya que analizando diariamente estas mediciones, podemos saber cómo se está dando el proceso de fermentación de las almendras de cacao, de esta manera se obtuvo como resultado una humedad y un pH que consecutivamente disminuyen obteniendo finalmente una acidez que gradualmente iba aumentando, debido a que ambos parámetros son inversamente proporcionales. Por otra parte, estos últimos parámetros fueron de suma importancia en las fermentaciones con cultivos ya que nos permitió saber la culminación del proceso fermentativo el cual oscila entre pH de 5,1 – 5,4 ya que si es menor a 5 indica la presencia de ácidos no volátiles indeseables dando aromas desagradables al producto.

5.2 Recomendaciones

- Elegir un método de fermentación adecuado dependiendo del tipo de material genético de cacao, el clima, la cantidad de granos y la tecnología disponible a nivel local.
- Realizar más estudios a profundidad usando diferentes concentraciones de microorganismos para la fermentación de cacao y así estandarizar de manera global la concentración de cepas que se necesita para fermentar una cierta cantidad de masa teniendo como objetivo común elevar la calidad del cacao.
- Efectuar la fermentación en un espacio que cuente con protección adecuada contra lluvia, viento y luz solar directa ya que puede afectar de cierta forma el proceso de fermentación de las almendras de cacao, una de ellas es la tenencia de moho en el interior del grano por la presencia de una humedad superior al 7%.
- Llevar a cabo los volteos o remociones cada 48 horas hasta que culmine el proceso fermentativo de las almendras de cacao, para que de esta manera pueda haber una máxima fermentación, caso contrario quedarán almendras sin fermentar y se obtendrá como resultado final granos violetas, pizarras, mohosas o infestadas.
- Tomar lecturas de temperatura cada cierto tiempo debido a que los primeros días de fermentación, la temperatura no es muy significativa comparada con las de los últimos días donde la temperatura debe llegar a los 50°C para que se dé la muerte del embrión y el grano de cacao llegue a completar su proceso de fermentación.
- Para las múltiples comparaciones concernientes a la calidad del cacao en grano beneficiado tanto en la fermentación con cultivos y sin cultivos se trabajó a partir del porcentaje de granos medianamente fermentados, debido a la cantidad de masa que se utilizó para las fermentaciones la cual fue de 1 kg, es por ello que para llegar a obtener granos de cacao bien fermentados se necesitaría una masa mínima de 35-40 kg según lo establecido por los agricultores encargados de estos procesos; adicionalmente la calidad de las almendras de cacao también depende de otros factores entre ellos: requerimientos agroclimáticos, temperatura, remoción o volteo, etc.

5.3 Bibliografía

- Afoakwa, O. (2009). Matrix effects on flavours volatiles release in dark chocolates varying in particle size distribution and fat content using GC-mass spectrometry and GC-olfactometry. *Food Chemistry*, 208-215.
- Agrocalidad. (2012). *Guía de buenas prácticas agrícolas para cacao*. MAGAP.
- Aguilar, C., & Guharay, F. (2013). *Caja de Herramientas para Cacao*. Obtenido de Caja de Herramientas para Cacao: <http://cacaomovil.com/guia/8/contenido/principales-caracteristicas/>
- Amores, Palacios, Jimenez, & Zhang. (2009). *Entorno ambiental , genética, atributos de calidad y singularización del cacao en el Nor Oriente de Esmeraldas*. Quevedo : United States Department of Agriculture.
- Anenacao. (2015). *Cacao Nacional . Anenacao*.
- Armijos, A. I. (2002). *Características de acidez como parámetro químico de calidad en muestras de cacao (Theobroma cacao L.) fino y ordinario de producción nacional durante la fermentación*. Tesis Licenciatura en Ciencias Químicas Especialización Química Anañítica, Pontificia Universidad Católica del Ecuador, Quito, Ecuador.
- Bailon, R. (2012). *Fermentaciones Industriales* . Lima : Solid Converter .
- Barriga, J. M. (2011). *PRODUCCIÓN Y COMERCIALIZACIÓN DEL CACAO EN EL ECUADOR PERIODO 2009-2010*. Tesis de Grado, Guayaquil.
- Beckett, S. T. (2009). *Industria Chocolate and Manufacture and Use*. York, UK: John Wiley & Sons.
- Braudeau. (1970). *El Cacao*. Barcelona.
- Braudeau, J. (1970). *El Cacao*. Barcelona: Blume.
- Bustamante, M. S., Tenorio, M. A., & Rojano, D. C. (2013). Efecto de la fermentación sobre la actividad antioxidante de diferentes clones de cacao colombiano . *Revista Cubana de Plantas Medicinales* , 2-10.
- Cubero, E. (1990). *Indicadores Químicos de la calidad del grano seco de cacao y su aplicación*. Tesis de Licenciatura, Universidad de Costa Rica, San José-Costa Rica.
- Cubillos, G., Menizalde, G., & Correa, E. (2008). *MANUAL DE BENEFICIO DEL CACAO*. Medellín (Antioquia): CORPORACION PARA INVESTIGACIONES BIOLOGICAS (CIB).
- Delgado. (2012). *Evaluación del proceso de fermentación tradicional y no tradicional de la semilla de cacao*. ANTIGUO CUSCATLAN: CREATIVE COMMONS.
- Dimick, & Hoskin. (1999). Chemistry of flavour development in chocolate. *In Industrial Chocolate manufacture and use, III*, 137-152.
- Enríquez G. A. (1966). *Selección y estudios de los caracteres de la flor, la hoja y la mazorca, útiles para identificación y descripción de cultivares de cacao*. Costa Rica: Universidad de Costa Rica.
- Enríquez, G. (1966). *Selección y estudios de los caracteres de la flor, la hoja y la mazorca, útiles*

- les para identificación y descripción de cultivares de cacao.* Costa Rica: Universidad de Costa Rica.
- ERAZO TORRES, R. F. (2015). "EVALUACIÓN DE LA APLICACIÓN DE *Lactobacillus*. SANTO DOMINGO : DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA Y DE LA AGRICULTURA .
- Erazo, F., & Mendoza, C. (2015). *Evaluacion de la aplicacion de Lactobacillus Fermentum y Acetobacter Aceti, en la fermentacion del cacao CCN-51 y su efecto en la calidad de las almendras.* Santo Domingo: Departamento de Ciencias de la Vida y de la Agricultura.
- ESTELA-ESCALANTE, W. D., D, P., RYCHTERA, M., D, P., MELZOCH, K., D, P., & MANUEL R. GUERRERO-OCHOA, M. (2012). INFLUENCIA DE LA AIREACIÓN EN LA ACTIVIDAD FERMENTATIVA DE *Kloeckera apiculata* DURANTE LA FERMENTACIÓN DE JUGO DE MANZANA. *Bdigital* , 1-10.
- FAO. (2012). *Manual para la preparación y venta de frutas y hortalizas.* Roma: Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura.
- Farah, D. H., Zaibunnisa, A. H., & Misnawi, S. J. (2012). Optimization of cocoa beans roasting process using Response Surface Methodology based on concentration of pirazynone and acrylamide. *International Food Research Journal*, 1355-1359.
- FUNDACITE. (2005). *Manejo del cacao: El cacao y su gente.* Obtenido de Manejo del cacao: El cacao y su gente: <http://www.cacao.fundacite.org.ve/manejo.html>
- García. (2008). *Caracterización del potencial genético del cacao en el Perú.* . Lima: Ministerio de Comercio Exterior y Turismo.
- Gerard, L. (2015). *CARACTERIZACIÓN DE BACTERIAS DEL ÁCIDO ACÉTICO DESTINADAS A LA PRODUCCIÓN DE VINAGRES DE FRUTAS* . Valencia: Departamento de Tecnología de Alimentos .
- Gerard, L. (2015). *CARACTERIZACIÓN DE BACTERIAS DEL ÁCIDO ACÉTICO DESTINADAS A LA PRODUCCIÓN DE VINAGRES DE FRUTAS* . Valencia: Departamento de Tecnología de Alimentos .
- Guerrero, G. (2015). El Cacao ecuatoriano Su historia empezó antes del siglo XV. *Lideres* , 3-6.
- Historia del cacao.* (22 de 02 de 2013). Obtenido de Historia del cacao: http://www.edualter.org/material/explotacion/unidad5_2.htm
- ICCO. (29 de May de 2013). Quarterly Bulletin of Cocoa Statistics. *International Cocoa Organization*, XXXIX(2).
- INIAP. (2016). *MANUAL PARA EL ANÁLISIS DE PARÁMETROS QUÍMICOS ASOCIADOS A LA CALIDAD DEL CACAO.* Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias (INIAP), Estación Experimental Santa Catalina. Quito, Ecuador: San Mateo. Obtenido de Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias, Estación Experimental Santa Catalina.
- IOCCC. (1990). Methods of Analysis. Analytica Method 40. Determination of the Red Colour Value of cocoa beans by spectroscopy. *International Office of Cocoa, Chocolate and Sugar Confectionary*, 5.

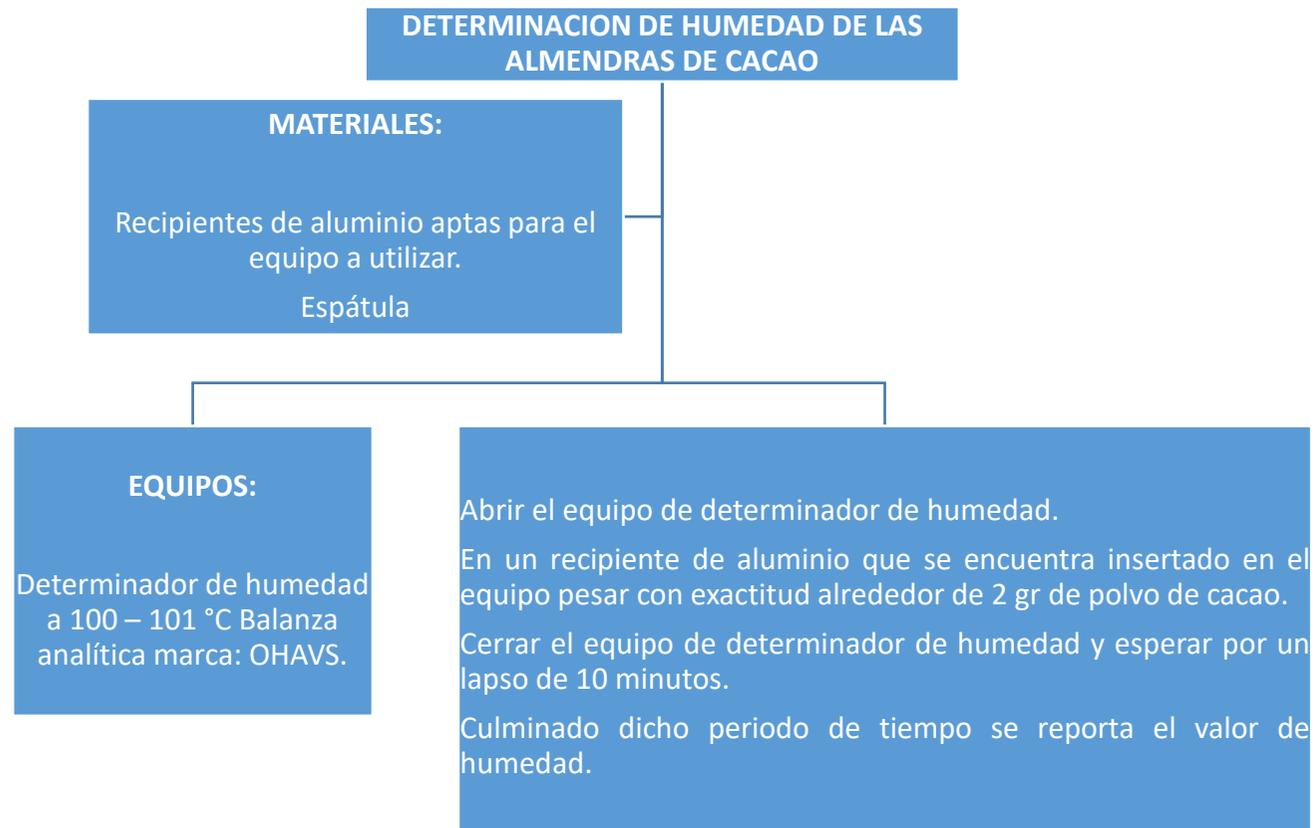
- Jano, P., & Mainville, D. (2007). *The Cacao Marketing Chain in Ecuador: Analysis of Chain Constraints To The Development Of Markets For High Quality Cacao*. Parma, Italy: IAMA.
- Jolly, D. A. (1957). *Manual del curso de cacao*. Costa Rica : Instituto Interamericano de Ciencias Agrícolas .
- Kresnowati, M. T. (2013). Improvement of Cocoa Beans Fermentation by LAB Starter Adition. *Journal of Medical and Bioengineering*, 2(4).
- Lefeber et.al De Vuyst, L. (September de 2011). Interesting Starter Culture Strains for Controlled Cocoa Bean Fermentation Revealed by Simulated Cocoa Pulp Fermentations of Cocoa-Specific Lactic Acid Bacteria. *AEM*, 77(18), 6694–6698. doi: 10.1128/AEM.00594-11
- Llerena, W. F. (2016). *Mejoramiento del proceso de fermentacion* . Sevilla - España : UNIVERSIDAD INTERNACIONAL DE ANDALUCÍA.
- Lozano, A. (8 de Junio de 2016). *CUANTIFICACIÓN DE MICROORGANISMOS POR TURBIDEZ*. Obtenido de CUANTIFICACIÓN DE MICROORGANISMOS POR TURBIDEZ: <http:// analisisaguaslozano.blogspot.com/2016/06/sesion-10.html>
- McFarland. (1990). *Pruebas bioquímicas para la identificación de bacterias de importancia clínica*. Médica Panamericana.
- Morales, A. (2015). *ESTANDARIZACION DEL PROCESO DE FERMENTACION DE LA MEZCLA DE SEMILLAS DE TRES ACCESIONES DE Theobroma cacao L. (CACAO) DEL CULTIVAR SAN JOSE DEL REAL DE LA CARRERA UBICADA EN EL DEPARTAMENTO DE USULUTAN*. . El Salvador: Universidad Del Salvador.
- Morin, D., & Moore, D. L. (2010). Acetobacter Aceti . *Microbe Wiki* , 3-10.
- Mozzi, F. e. (2015). *Biotechnology of Lactic Acid Bacteria: Novel Applications* (2da ed.). Oxford, UK: Offices.
- Nielsen, D. S. (2015). Cocoa Fermentation. *Trends in Microbiology*, 3.
- Orcés, A. A., & Piedra, N. V. (2012). *Mejoramiento de las Características Sensoriales del Cacao* . Guayaquil : ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DEL LITORAL.
- Palma, I. H. (2013). *Fermentacion del cacao*. Guatemala: Universidad de San Carlos .
- Pazmiño Aldaz, K. O. (2005). *Estudio del comportamiento de fructosa, glucosa y sacarosa en almendras de cacao de producción nacional durante la fermentación*. Tesis de grado, Escuela Superior Politécnica de Chimborazo. Escuela de Ciencias, Facultade de Ciencias Químicas, Riobamba, Ecuador.
- Pereira G, V. D. (2012). Microbiological and physicochemical characterization of small-scale cocoa fermentations and screening of yeast and bacterial strain to develop a defined starter culture. *ASM*, 78, 5395-5405.
- Pontillon, J. (1997). Cacao et chocolat: Production, utilitacion, caractéristiques. *Sciences et techniques alimentaires*, 481-489.
- Presilla, M. (10 de Abril de 2015). *Corporacion Fortaleza del Valle*. Obtenido de Corporacion Fortaleza del Valle: <http://fortalezadelvalle.org/ecuador-tiendos-tipos-de-cacao/>

- ProEcuador. (2017). *PERFIL DEL SECTOR DE CACAO Y ELABORADOS*. GUAYAQUIL: MINISTERIO DE COMERCIO EXTERIOR.
- Quiroz, J. (2010). *Influencia de la economía y cosecha sobre la calidad del cacao*. Ecuador: Boletín técnico.
- Ramli, N., & Hassan, O. (2006). Influence of roasting condition on volatile flavour of roasted Malaysian cocoa beans. *J. Food*, 280-298.
- Recalde. (2007). *Evaluación del efecto del presecado y tiempo de fermentación, en los contenidos de polifenoles totales, alcaloides y ácidos volátiles en dos genotipos de cacao*. Quito: Universidad Central del Ecuador - Facultad de Ciencias Químicas.
- Rico, M. (16 de 04 de 2015). *Wikimedia*. Obtenido de Bioteki: <http://www.biotekis.es/2015/04/16/chocobioteologia-i/>
- Rios, M. (26 de Marzo de 2016). *La Química del Chocolate*. Obtenido de La Química del Chocolate : <https://iquimicas.com/la-quimica-del-chocolate/>
- Rivadeneria, A. (2013). *Propuesta para el mejoramiento del manejo poscosecha del cacao (Theobroma cacao) de la variedad CCN-51 en el Cantón Quinsaloma*. Quito: Universidad Central del Ecuador.
- Rivera, C., & Morales, A. (2015). *ESTANDARIZACION DEL PROCESO DE FERMENTACION DE LA MEZCLA DE SEMILLAS DE TRES ACCESIONES DE Theobroma cacao L. (CACAO) DEL CULTIVAR SAN JOSE DEL REAL DE LA CARRERA UBICADA EN EL DEPARTAMENTO DE USULUTAN*. El Salvador : UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR FACULTAD DE QUIMICA Y FARMACIA .
- RYCHTERA, M., & MELZUCH, K. (2012). INFLUENCIA DE LA AIREACIÓN EN LA ACTIVIDAD FERMENTATIVA DE *Kloeckera apiculata* DURANTE LA FERMENTACIÓN DE JUGO DE MANZANA. *Bdigital*, 1-10.
- Sanchez, V. (2007). *Caracterización organoléptica del cacao (Theobroma cacao L.) , para la selección de árboles con perfiles de sabor de interés comercial. .* Quedo: UTEQ.
- Schwan, R. F. (April de 1998). Cocoa Fermentations Conducted with a Defined Microbial Cocktail Inoculum. *ASM*, 64(4), 1477–1483.
- SINAGAP. (2015). *Sistema de Información Nacional de Agricultura, Ganadería, Acuicultura y Pesca*. Obtenido de MAGAP, Ministerio de Agricultura, Ganadería, Acuicultura y Pesca, Subsecretaría de comercialización. Cadenas agroproductivas, Cacao: <http://sinagap.agricultura.gob.ec/>
- Thompson, R. (2001). Plant proanthocyanidins Part 1. Introduction; the isolation, structure, and distribution in nature of plant procyanidins. En *Perkin Transactions 1* (págs. 1387-1399). doi:10.1039/P19720001387
- Thompson, S. S., Miller, K. B., & Lopez, A. S. (2001). *Cocoa and coffee* (2nd ed.). (M. P. Doyle , L. R. Beuchat, & T. J. Montville, Edits.) Washington, DC: ASM Press.
- Voigt, J. (1994). In vitro formation of cocoa-specific aroma precursors: aromarelated peptides generated from cocoa seed protein by co-operation of an aspartic endoprotease and a carboxypeptidase. *Food Chem*, 41-45.

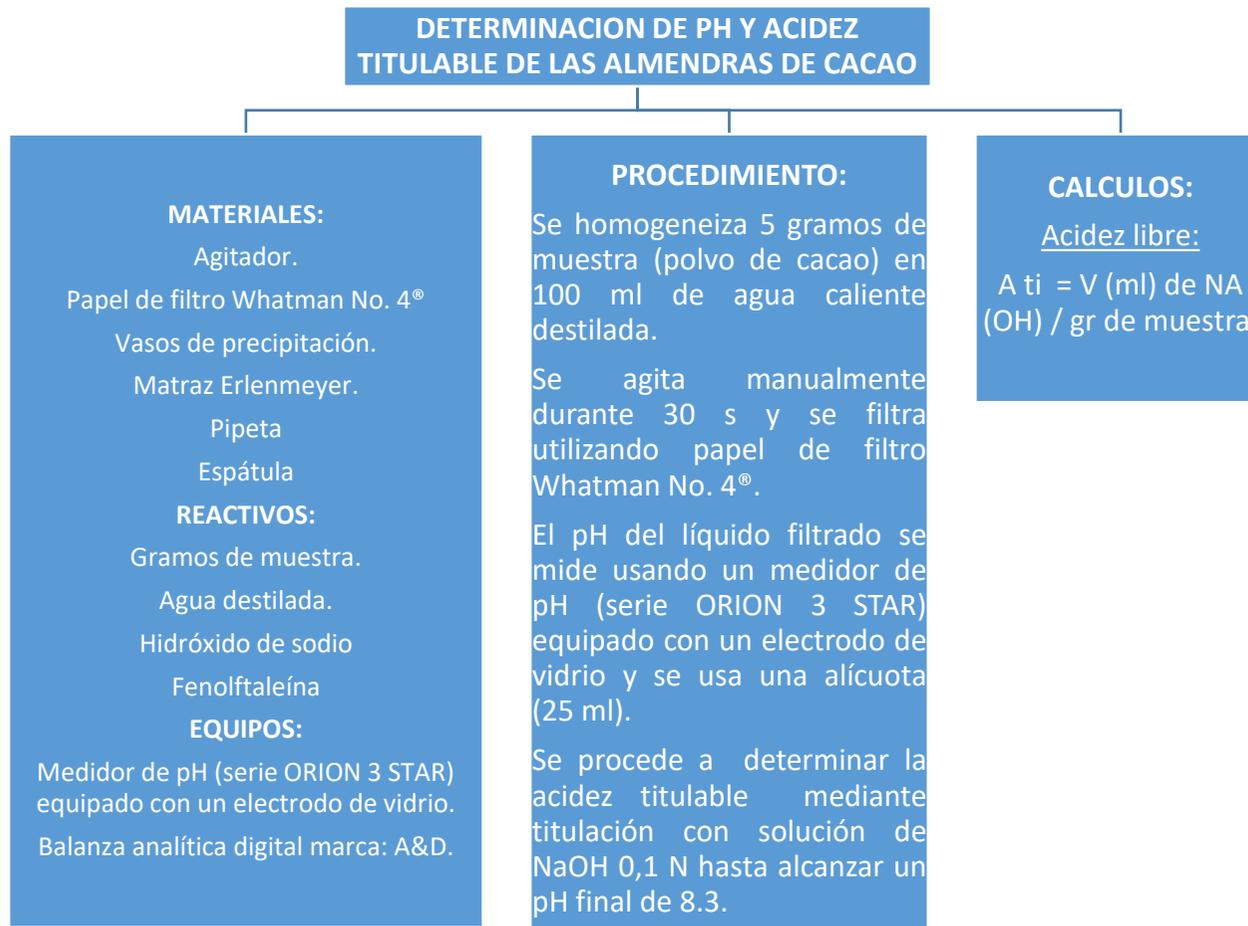
- Wacher, M. (2011). Microorganismos y Chocolate. *Digital Universitaria*, 3.
- Wakao. (2002). *Estudio de la variación del contenido de alcaloides en cacao (Theobroma cacao L.) de producción Nacional, durante el proceso de beneficio*. Quito: Pontificia Universidad Católica del Ecuador.
- Zumárraga, M., & Barbero, F. (2012). *Contribución organoléptica en la vinificación*. Lima: Departamento Enología GUSERBIOT S.L.U.

5.4 Apéndice

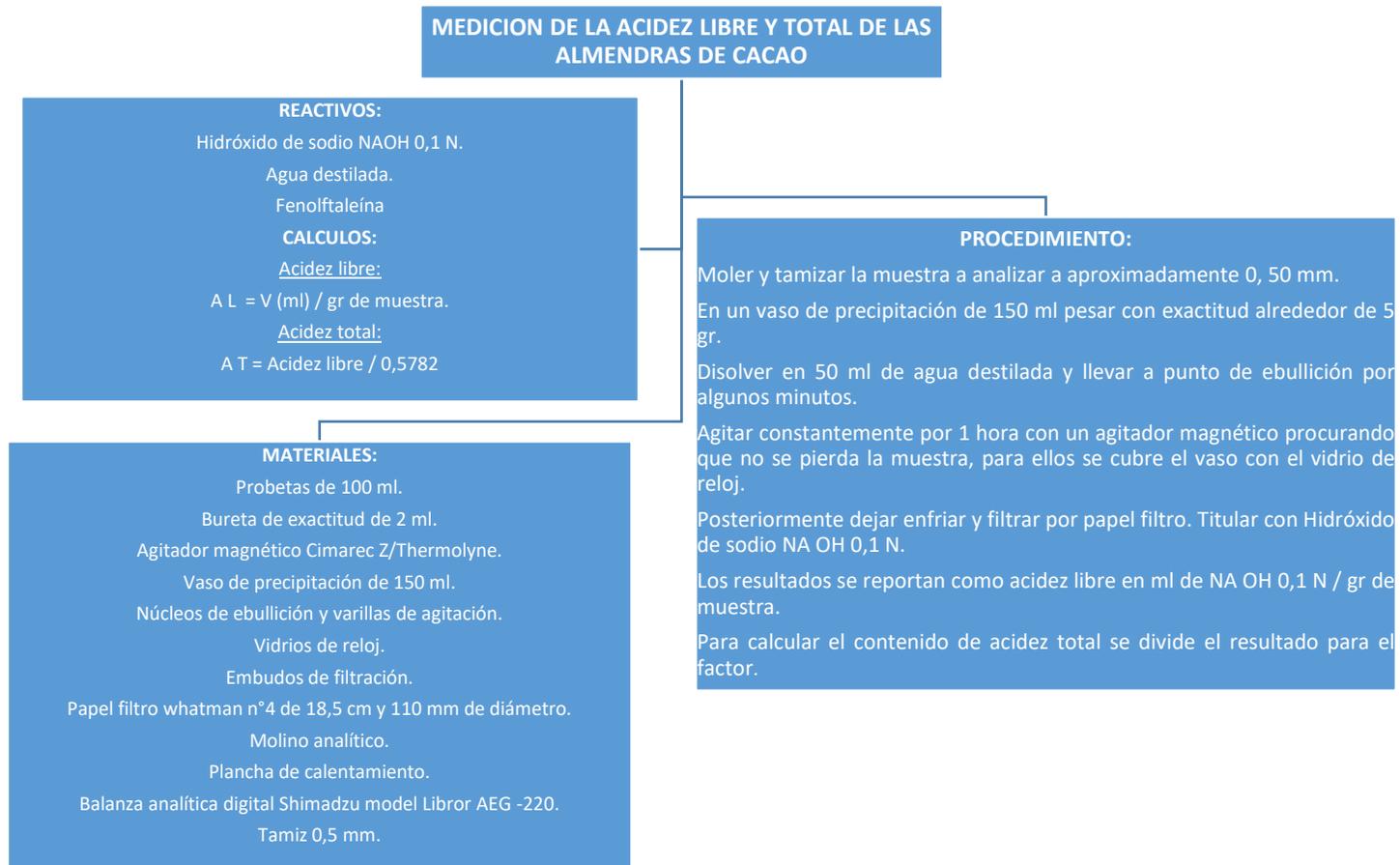
CUADRO 3 EQUIPOS, MATERIALES Y PROCEDIMIENTO PARA LA DETERMINACIÓN DE HUMEDAD (INIAP, 2016)



CUADRO 4 EQUIPOS, MATERIALES Y PROCEDIMIENTO PARA LA DETERMINACIÓN DE PH Y ACIDEZ TITULABLE
(Armijos, 2002)



CUADRO 5 EQUIPOS, MATERIALES Y PROCEDIMIENTO PARA LA DETERMINACIÓN DE ACIDEZ LIBRE Y TOTAL
(Pontillon, 1997)



CUADRO 6 PRUEBAS MORFOLÓGICAS PARA LA IDENTIFICACIÓN DE CEPAS

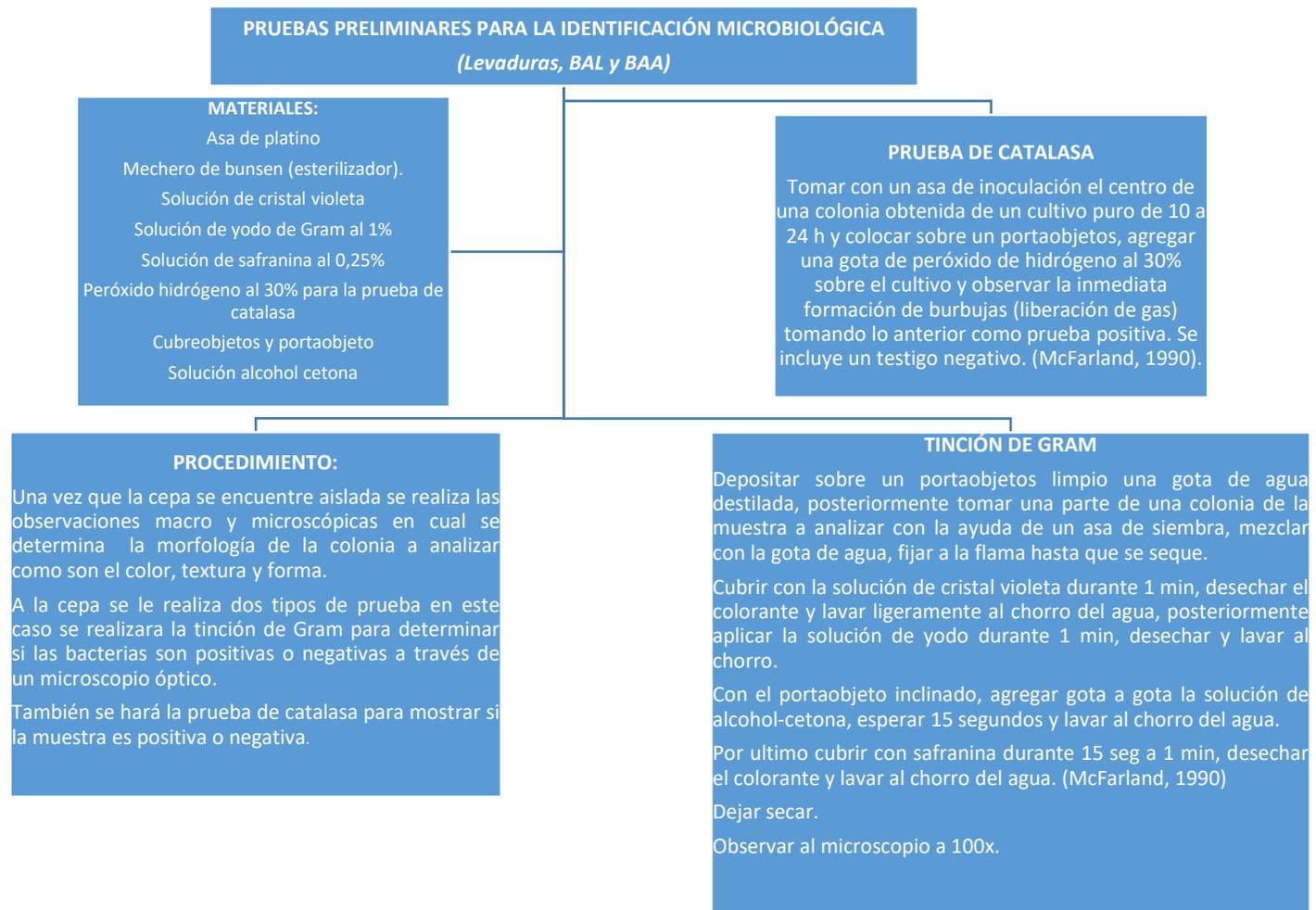


GRÁFICO 11 ANÁLISIS FÍSICOQUÍMICO DEL CACAO TIPO NACIONAL CLON 103 FERMENTADO POR EL MÉTODO DE CAJÓN

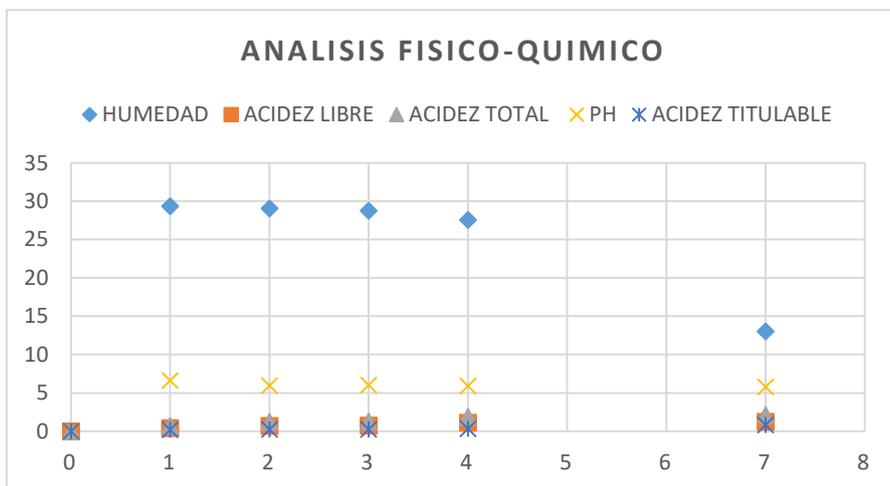


GRÁFICO 12 ANÁLISIS FÍSICOQUÍMICO DEL CACAO TIPO NACIONAL FERMENTADO POR EL MÉTODO DE TENDAL O MONTÓN

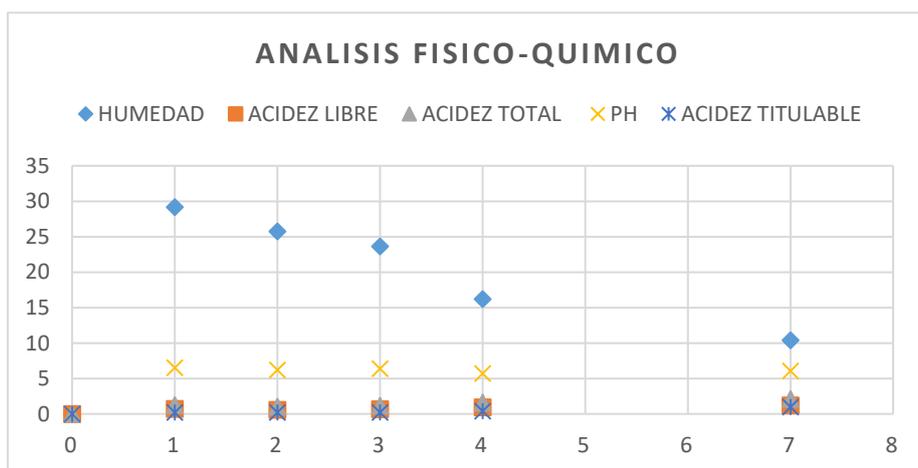


GRÁFICO 13 ANÁLISIS FÍSICOQUÍMICO DEL CACAO TIPO CCN-51 FERMENTADO POR EL MÉTODO DE CAJÓN

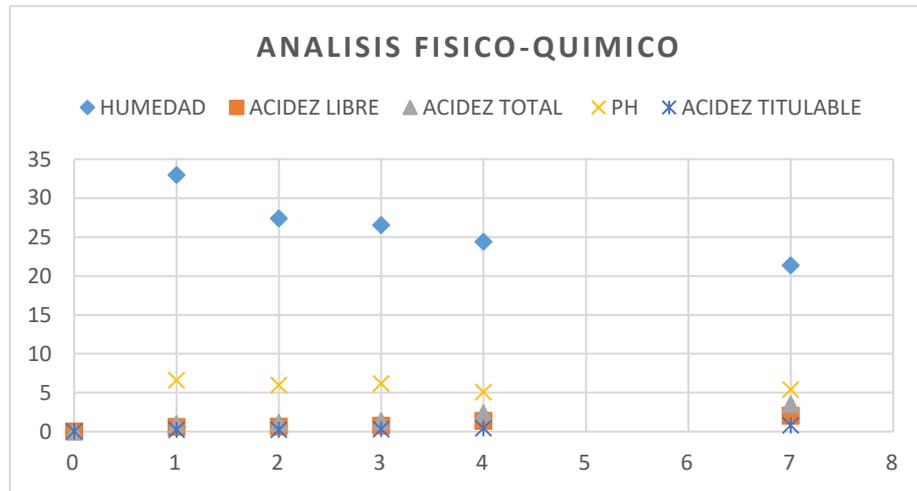
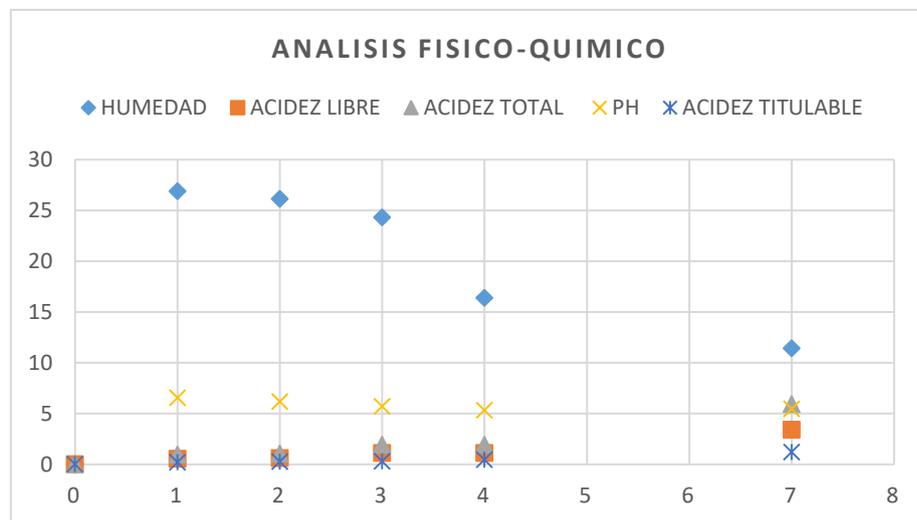


GRÁFICO 14 ANÁLISIS FÍSICOQUÍMICO DEL CACAO TIPO CCN-51 FERMENTADO POR EL MÉTODO DE TENDAL O MONTÓN



RECUENTO MICROBIANO EN LA FERMENTACIÓN SIN CULTIVOS INICIADORES

TABLA 28 DINÁMICA MICROBIANA EN LA FERMENTACIÓN SIN CULTIVOS DEL DÍA 1 EXPRESADO EN [LOG UFC/G]

DÍA 1			
Tratamientos	Levaduras	BAL	BAA
51-T	5,227	4,349	4,039
51-C	5,218	4,349	4,467
NC	4,451	5,215	4,389
NT	5,213	4,451	5,238

TABLA 29 DINÁMICA MICROBIANA EN LA FERMENTACIÓN SIN CULTIVOS DEL DÍA 3 EXPRESADO EN [LOG UFC/G]

DÍA 3			
Tratamientos	Levaduras	BAL	BAA
51-T	4,349	5,203	4,469
51-C	4,34	5,21	4,451
NC	4,349	4,467	4,477
NT	4,326	5,213	4,456

TABLA 30 DINÁMICA MICROBIANA EN LA FERMENTACIÓN SIN CULTIVOS DEL DÍA 5 EXPRESADO EN [LOG UFC/G]

DÍA 5			
Tratamientos	Levaduras	BAL	BAA
51-T	4,389	5,219	4,889
51-C	4,389	5,15	5,19
NC	4,15	5,198	5,237
NT	4	5,238	5,231

TABLA 31 DINÁMICA MICROBIANA EN LA FERMENTACIÓN SIN CULTIVOS DEL DÍA 7 EXPRESADO EN [LOG UFC/G]

DÍA 7			
Tratamientos	Levaduras	BAL	BAA
51-T	4,253	5,15	5,451
51-C	4,15	5,191	5,324
NC	4	5,139	5,088
NT	3,891	4,977	5,018

Fermentación Con Cultivos Iniciadores

Escala McFarland: En microbiología, los estándares de turbidez de McFarland se usan como referencia en suspensiones bacteriológicas para saber que el número de bacterias por mililitro, o más bien en UFC según una escala que va de 0.5 a 10. Estos estándares son creados al mezclar soluciones de cloruro de bario con ácido sulfúrico en volúmenes específicos.

Primero se realizan los cálculos para saber lo que se necesita en el cloruro de bario y el ácido sulfúrico, se preparan los dos compuestos en matraces aforados, con la rotulación pertinente.

Una vez hecho esto, se preparan los 11 tubos que hay que preparar, ayudándose de la tabla.

TABLA 32 PREPARACIÓN ESCALA MCFARLAND

Nº	BaCl ₂ 0,048M ml	H ₂ SO ₄ 0,36M ml	Vf ml	Nº Células
0,5	0,05	9,95	10	1,5 · 10 ⁸
1	0,1	9,9	10	3 · 10 ⁸
2	0,2	9,8	10	6 · 10 ⁸
3	0,3	9,7	10	9 · 10 ⁸
4	0,4	9,6	10	12 · 10 ⁸
5	0,5	9,5	10	15 · 10 ⁸
6	0,6	9,4	10	18 · 10 ⁸
7	0,7	9,3	10	21 · 10 ⁸
8	0,8	9,2	10	24 · 10 ⁸
9	0,9	9,1	10	27 · 10 ⁸
10	1	9	10	30 · 10 ⁸

Fuente: (Lozano, 2016)

A partir del espectrofotómetro se mide la absorbancia del blanco el cual será el agua destilada estéril. Una vez hecho esto, se toman cuatro tubos (0; 0,5; 3; 5; 6), siendo estos suficientes para representar lo que buscamos, y se miden su absorbancia los cuales deberán medirse a 550 nanómetros.

Interpretamos UFC como x , y la Absorbancia como y , como se muestra en la siguiente tabla:

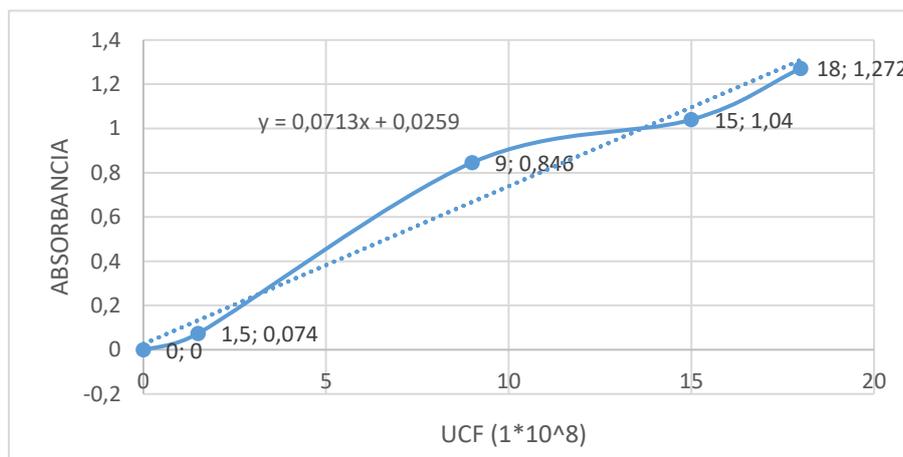
TABLA 33 PUNTOS REPRESENTATIVOS DE LA ESCALA MCFARLAND

Nº TUBO	UFC	ABSORBANCIA
0	0	0
0,5	$1,5 \cdot 10^8$	0,074
3	$9 \cdot 10^8$	0,846
5	$15 \cdot 10^8$	1,040
6	$18 \cdot 10^8$	1,272

Fuente: (Lozano, 2016)

Con la tabla anterior se construye una gráfica donde se relacione los UFC vs la absorbancia de las muestras, obteniendo de dicha gráfica, una ecuación, donde en Y se pondrá la absorbancia del agua peptonada sembrada y consecuentemente, despejando la variable X saldrá el número de células por mililitro.

GRÁFICO 15 ESCALA MCFARLAND



Fuente: (Lozano, 2016)

A partir de la presente ecuación se podrá determinar las concentraciones de microorganismos que se necesitará para los procesos de Fermentación Con cultivos Inicidores, recordando que este resultado hay que multiplicarlo por 10 elevado a 8.

Siendo:

X = UFC/ml

Y= Absorbancias

$$y = 0,0713 x + 0,0259$$

Fuente: (Lozano, 2016)

Análisis fisicoquímico en la fermentación con cultivos iniciadores

TABLA 34 ANÁLISIS FISICOQUÍMICOS DE LOS 8 TRATAMIENTOS ESTABLECIDOS EN LA FERMENTACIÓN CON CULTIVOS INICIADORES

TRATAMIENTO	METODO DE FERMENTACION	CACAO TIPO	DIAS DE FERMENTACION	HUMEDAD	ACIDEZ LIBRE	ACIDEZ TOTAL	PH	ACIDEZ TITULABLE
1	CAJON	NACIONAL	0	0	0	0	0	0
			1	30	0,26	0,449	6,73	0,1
			2	28,53	0,42	0,726	6,56	0,12
			3	26,7	0,44	0,76	6,02	0,16
			4	20,32	0,46	0,796	5,61	0,2
TRATAMIENTO	METODO DE FERMENTACION	CACAO TIPO	DIAS DE FERMENTACION	HUMEDAD	ACIDEZ LIBRE	ACIDEZ TOTAL	PH	ACIDEZ TITULABLE
2	CAJON	NACIONAL	0	0	0	0	0	0
			1	30	0,3	0,518	6,46	0,1
			2	28,33	0,32	0,553	6,44	0,14
			3	26,32	0,44	0,76	6,04	0,2
			4	17	0,46	0,7955	5,42	0,22
TRATAMIENTO	METODO DE FERMENTACION	CACAO TIPO	DIAS DE FERMENTACION	HUMEDAD	ACIDEZ LIBRE	ACIDEZ TOTAL	PH	ACIDEZ TITULABLE
1	TENDAL	NACIONAL	0	0	0	0	0	0
			1	30	0,22	0,38	6,74	0,1
			2	25,42	0,28	0,484	6,55	0,12
			3	23,34	0,46	0,795	6,53	0,12
			4	20,1	0,5	0,8647	6,18	0,3
TRATAMIENTO	METODO DE FERMENTACION	CACAO TIPO	DIAS DE FERMENTACION	HUMEDAD	ACIDEZ LIBRE	ACIDEZ TOTAL	PH	ACIDEZ TITULABLE
2	TENDAL	NACIONAL	0	0	0	0	0	0
			1	35	0,3	0,518	6,57	0,12
			2	29,82	0,34	0,588	6,3	0,12
			3	24,57	0,44	0,76	6,04	0,22
			4	16,44	1,1	1,9	5,47	0,5
TRATAMIENTO	METODO DE FERMENTACION	CACAO TIPO	DIAS DE FERMENTACION	HUMEDAD	ACIDEZ LIBRE	ACIDEZ TOTAL	PH	ACIDEZ TITULABLE
1	CAJON	CCN-51	0	0	0	0	0	0
			1	30	0,14	0,242	6,62	0,06
			2	26,65	0,34	0,588	6,54	0,08
			3	24,2	0,32	0,553	6,49	0,14
			4	16,21	0,42	0,726	5,51	0,2
TRATAMIENTO	METODO DE FERMENTACION	CACAO TIPO	DIAS DE FERMENTACION	HUMEDAD	ACIDEZ LIBRE	ACIDEZ TOTAL	PH	ACIDEZ TITULABLE
2	CAJON	CCN-51	0	0	0	0	0	0
			1	30	0,2	0,34	6,55	0,06
			2	26,77	0,22	0,38	6,3	0,06
			3	25,42	0,48	0,83	6,61	0,14
			4	17,2	0,54	0,933	5,55	0,3
TRATAMIENTO	METODO DE FERMENTACION	CACAO TIPO	DIAS DE FERMENTACION	HUMEDAD	ACIDEZ LIBRE	ACIDEZ TOTAL	PH	ACIDEZ TITULABLE
1	TENDAL	CCN-51	0	0	0	0	0	0
			1	25	0,2	0,34	6,65	0,14
			2	23,2	0,3	0,5188	6,46	0,16
			3	20,12	0,3	0,5188	6,49	0,24
			4	17,56	0,4	0,6918	5,41	0,42
TRATAMIENTO	METODO DE FERMENTACION	CACAO TIPO	DIAS DE FERMENTACION	HUMEDAD	ACIDEZ LIBRE	ACIDEZ TOTAL	PH	ACIDEZ TITULABLE
2	TENDAL	CCN-51	0	0	0	0	0	0
			1	30	0,32	0,553	6,56	0,08
			2	27,14	0,36	0,622	6,51	0,12
			3	24,88	0,4	0,692	6,52	0,28
			4	21,36	0,56	0,9685	6,27	0,28

TABLA 35 ANÁLISIS FÍSICOQUÍMICO DEL CACAO TIPO NACIONAL CLON 103 FERMENTADO POR EL MÉTODO DE CAJÓN

TRATAMIENTO	METODO DE FERMENTACION	CACAO TIPO	DIAS DE FERMENTACION	HUMEDAD	ACIDEZ LIBRE	ACIDEZ TOTAL	PH	ACIDEZ TITULABLE
2	CAJON	NACIONAL CLON 103	0	0	0	0	0	0
			1	30	0,3	0,518	6,46	0,1
			2	28,33	0,32	0,553	6,44	0,14
			3	26,32	0,44	0,76	6,04	0,2
			4	17	0,46	0,7955	5,42	0,22

GRÁFICO 16 ANÁLISIS FÍSICOQUÍMICO DEL CACAO TIPO NACIONAL CLON 103 FERMENTADO POR EL MÉTODO DE CAJÓN

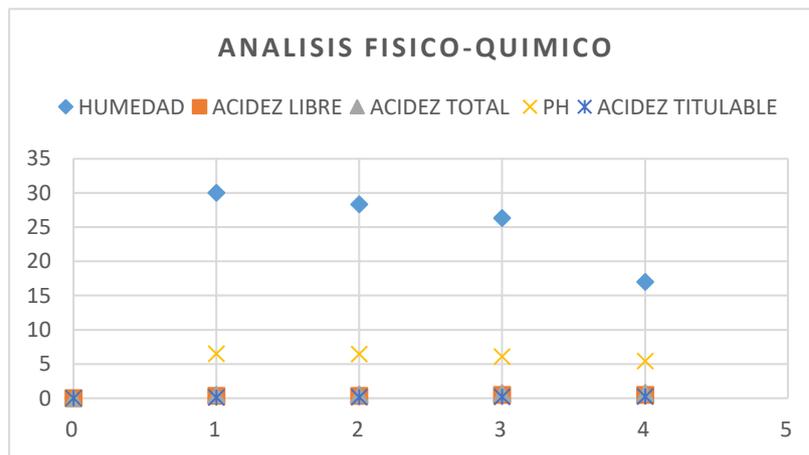


TABLA 36 ANÁLISIS FÍSICOQUÍMICO DEL CACAO TIPO NACIONAL CLON 103 FERMENTADO POR EL MÉTODO DE TENDAL O MONTÓN

TRATAMIENTO	METODO DE FERMENTACION	CACAO TIPO	DIAS DE FERMENTACION	HUMEDAD	ACIDEZ LIBRE	ACIDEZ TOTAL	PH	ACIDEZ TITULABLE
2	TENDAL	NACIONAL CLON 103	0	0	0	0	0	0
			1	35	0,3	0,518	6,57	0,12
			2	29,82	0,34	0,588	6,3	0,12
			3	24,57	0,44	0,76	6,04	0,22
			4	16,44	1,1	1,9	5,47	0,5

GRÁFICO 17 ANÁLISIS FÍSICOQUÍMICO DEL CACAO TIPO NACIONAL CLON 103 FERMENTADO POR EL MÉTODO DE TENDAL O MONTÓN

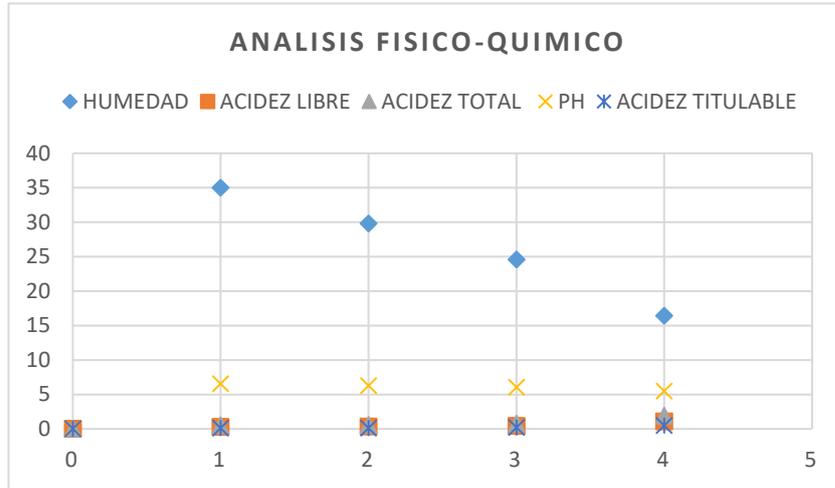
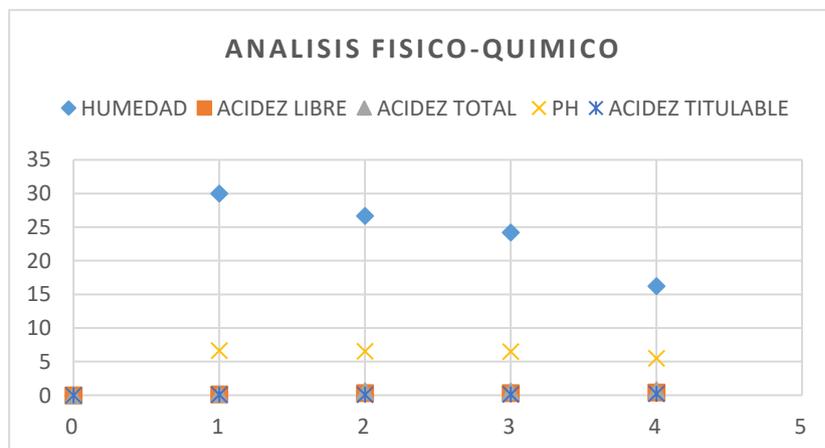


TABLA 37 ANÁLISIS FÍSICOQUÍMICO DEL CACAO TIPO CCN-51 FERMENTADO POR EL MÉTODO DE CAJÓN

TRATAMIENTO	METODO DE FERMENTACION	CACAO TIPO	DIAS DE FERMENTACION	HUMEDAD	ACIDEZ LIBRE	ACIDEZ TOTAL	PH	ACIDEZ TITULABLE
1	CAJON	CCN-51	0	0	0	0	0	0
			1	30	0,14	0,242	6,62	0,06
			2	26,65	0,32	0,553	6,54	0,08
			3	24,2	0,34	0,588	6,49	0,14
			4	16,21	0,42	0,726	5,51	0,2

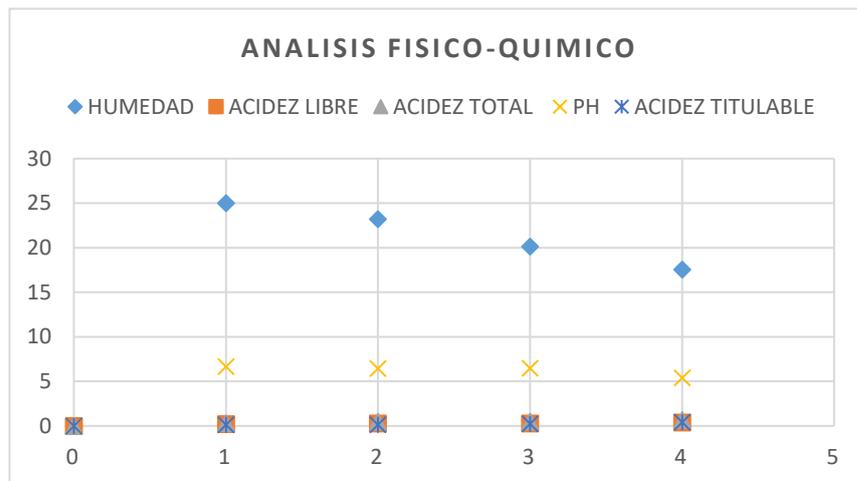
GRÁFICO 18 ANÁLISIS FÍSICOQUÍMICO DEL CACAO TIPO CCN-51 FERMENTADO POR EL MÉTODO DE CAJÓN



**TABLA 38 ANÁLISIS FÍSICOQUÍMICO DEL CACAO TIPO CCN-51
FERMENTADO POR EL MÉTODO DE TENDAL O MONTÓN**

TRATAMIENTO	METODO DE FERMENTACION	CACAO TIPO	DIAS DE FERMENTACION	HUMEDAD	ACIDEZ LIBRE	ACIDEZ TOTAL	PH	ACIDEZ TITULABLE
1	TENDAL	CCN-51	0	0	0	0	0	0
			1	25	0,2	0,34	6,65	0,14
			2	23,2	0,3	0,5188	6,46	0,16
			3	20,12	0,3	0,5188	6,49	0,24
			4	17,56	0,4	0,6918	5,41	0,42

**GRÁFICO 19 ANÁLISIS FÍSICOQUÍMICO DEL CACAO TIPO CCN-51
FERMENTADO POR EL MÉTODO**



RECUENTO MICROBIANO EN LA FERMENTACIÓN CON CULTIVOS INICIADORES

TABLA 39 DINÁMICA MICROBIANA EN TODOS LOS TRATAMIENTOS DEL DÍA 1 EXPRESADO EN [LOG UFC/G]

DÍA 1			
Tratamientos	Levaduras	BAL	BAA
T1 51-T	5,236	5,235	5,237
T2 51-T	5,238	5,237	5,2385
T1 51-C	5,236	5,2385	5,2385
T2 51-C	5,237	5,2385	5,235
T1 NC	5,238	5,237	5,2385
T2 NC	5,2385	5,235	5,237
T1 NT	5,2385	5,237	5,235
T2 NT	5,2385	5,237	5,235

TABLA 40 DINÁMICA MICROBIANA EN TODOS LOS TRATAMIENTOS DEL DÍA 3 EXPRESADO EN [LOG UFC/G]

DÍA 3			
Tratamientos	Levaduras	BAL	BAA
T1 51-T	5,2315	5,236	5,2285
T2 51-T	5,2	5,227	5,236
T1 51-C	5,1845	5,2155	5,235
T2 51-C	5,2155	5,234	5,2315
T1 NC	5,2285	5,226	5,238
T2 NC	5,225	5,233	5,234
T1 NT	5,2155	5,2385	5,2385
T2 NT	5,167	5,238	5,2155

TABLA 41 DINÁMICA MICROBIANA EN TODOS LOS TRATAMIENTOS DEL DÍA 5 EXPRESADO EN [LOG UFC/G]

Día 5			
Tratamientos	Levaduras	BAL	BAA
T1 51-T	5,034	5,2385	5,2385
T2 51-T	4,962	5,176	5,2155
T1 51-C	5,1275	5,198	5,2385
T2 51-C	5,131	5,2385	5,2385
T1 NC	5,12	5,161	5,2385
T2 NC	5,1275	5,2385	5,2385
T1 NT	5,079	5,234	5,2385
T2 NT	5,1045	5,2315	5,2385

TABLA 42 DINÁMICA MICROBIANA EN TODOS LOS TRATAMIENTOS DEL DÍA 7 EXPRESADO EN [LOG UFC/G]

Día 7			
Tratamientos	Levaduras	BAL	BAA
T1 51-T	4,889	5,2055	5,236
T2 51-T	4,8995	5,079	5,233
T1 51-C	5,1085	5,06	5,225
T2 51-C	5,079	5,1275	5,234
T1 NC	5,088	5,079	5,2305
T2 NC	5,12	5,161	5,236
T1 NT	5,06	5,0745	5,2385
T2 NT	5,088	5,2105	5,234

ENSAYO DE CORTE

TABLA 43 ENSAYO DE CORTE REALIZADAS A LAS FERMENTACIONES SIN CULTIVOS INICIADORES

METODO DE FERMENTACION	CACAO TIPO	PESO PARA EL LICOR DE CACAO (GR)	PESO DE 100 ALMENDRAS (GR)	% GRANOS BIEN FERMENTADOS	% GRANOS MEDIANAMENTE FERMENTADOS	% GRANOS VIOLETAS	% GRANOS PIZARRAS	% GRANOS MOHOSOS	% GRANOS INFESTADOS
CAJON	NACIONAL	74	162,88	2	56	34	8	0	0
TENDAL	NACIONAL	86,53	146,16	4	46	0	0	50	0
CAJON	CCN-51	69,46	154,73	10	87	3	0	0	0
TENDAL	CCN-51	68,29	168,55	5	55	35	5	0	0

TABLA 44 ENSAYO DE CORTE REALIZADAS A LAS FERMENTACIONES CON CULTIVOS INICIADORES

TRATAMIENTO	METODO DE FERMENTACION	CACAO TIPO	PESO PARA EL LICOR DE CACAO (GR)	PESO DE 100 ALMENDRAS (GR)	% GRANOS BIEN FERMENTADOS	% GRANOS MEDIANAMENTE FERMENTADOS	% GRANOS VIOLETAS	% GRANOS PIZARRAS	% GRANOS MOHOSOS	% GRANOS INFESTADOS
1	CAJON	NACIONAL	347,5	149,09	12	59	0	0	25	0
2	CAJON	NACIONAL	369,15	150,4	10	75	0	0	15	0
1	TENDAL	NACIONAL	237	163,9	3	66	0	31	0	0
2	TENDAL	NACIONAL	208,16	162,46	12	71	0	17	0	0
1	CAJON	CCN-51	316,49	160,72	0	41	0	44	15	0
2	CAJON	CCN-51	265,94	158,03	0	38	7	39	16	0
1	TENDAL	CCN-51	272,3	166,73	0	67	14	19	0	0
2	TENDAL	CCN-51	295,27	169,12	0	57	19	24	0	0

GRÁFICO 20 HISTOGRAMA: REPRESENTA EL PORCENTAJE DE FERMENTACIÓN EN EL MÉTODO SIN CULTIVOS

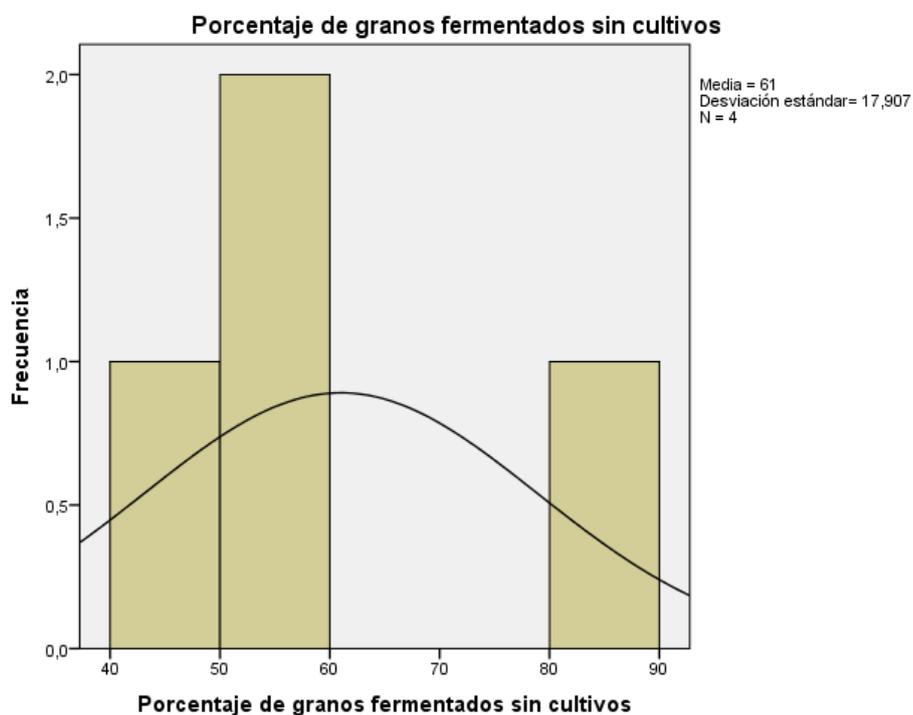


GRÁFICO 21 HISTOGRAMA: REPRESENTA EL PORCENTAJE DE FERMENTACIÓN EN EL MÉTODO CON CULTIVOS

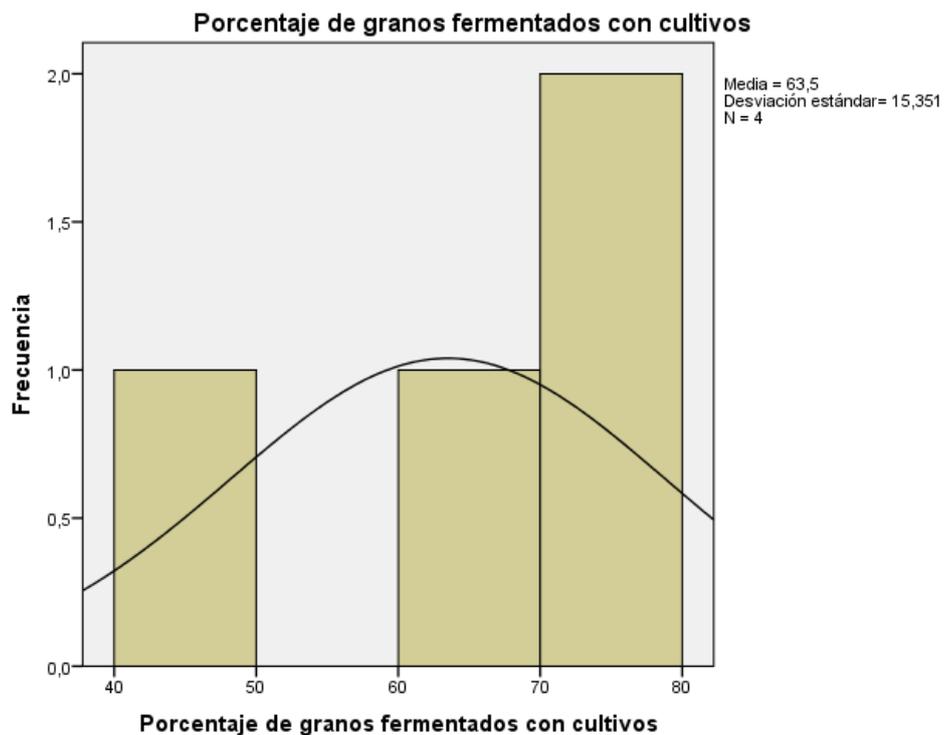


TABLA 45 REQUISITOS DE CALIDAD DEL CACAO EN GRANO BENEFICIADO SEGÚN LA NORMA INEN 176

REQUISITOS	UNIDAD	ARRIBA					CCN51
		A.S.S.P.S	A.S.S.S	A.S.S	A.S.N.	A.S.E.	
Cien granos pesan	g	135-140	130-135	120-125	110-115	105-110	135-140
Buena fermentación (mín.)	%	75	65	60	44	26	***65
Ligera fermentación* (mín.)	%	10	10	5	10	27	11
Violeta (máx.)	%	10	15	21	25	25	18
Pizarroso (pastoso) (máx)	%	4	9	12	18	18	5
Moho (máx.)	%	1	1	2	3	4	1
TOTALES (análisis sobre 100 pepas)	%	100	100	100	100	100	100
Defectuosos (análisis sobre 500 gramos) (máx).	%	0	0	1	3	**4	1
TOTAL FERMENTADO (mín.)	%	85	75	65	54	53	76
A.S.S.P.S	Arriba Superior Summer Plantación selecta						
A.S.S.S	Arriba Superior Summer Selecto						
A.S.S.	Arriba Superior Selecto						
A.S.N.	Arriba Superior Navidad						
A.S.E.	Arriba superior Época						
* Coloración marrón violeta							
** Se permite la presencia de granza solamente para el tipo A.S.E.							
*** La coloración varía de marrón a violeta							

TABLA 46 COSTOS DE PRODUCCIÓN DE LA UTILIZACIÓN DE CULTIVOS INICIADORAS EN EL CACAO

COSTOS DE PRODUCCIÓN			
Insumos	Cantidad	Costo por unidad (\$)	Costo Total (\$)
Levaduras	-	-	-
B. Lácticas	-	-	-
B. Acéticas	-	-	-
Cajas Petri desechables	330	0,2	66
Agar M.R.S.	1	69,47	69,47
Agar P.D.A.	1	43	43
Agar manitol	1	59,15	59,15
Agua de Peptona	1	33,56	33,56
Asas bacteriológicas descartables	100	0,1	10
Discos de ocytetracycline 100 mg/lt	50	12,5	12,5
Algodón estéril	1	1	1
Hisopos estériles	1	30	30
Fenolftaleína	500 ml	17,9	17,9
Peróxido de Hidrogeno al 30%	1 Lt	7,5	7,5
Solución de cristal violeta	1 Lt	6,58	6,58
Solución de yodo al 1%	1 Lt	3,5	3,5
Solución de safranina al 0,25%	1 Lt	8,5	8,5
Sorbato de potasio	30 g	1	1
Solución de alcohol cetona	1 Lt	6,8	6,8
Portaobjetos	100	3,1	3,1
Cubreobjetos	100	3,2	3,2
Cofia	100	9,8	9,8
Guantes	100	16,2	16,2
Mascarillas	50	5,2	5,2
Puntas estériles para pipeta automática	1000	7,15	7,15
Tubos de ensayo	100	16,45	16,45
Marcadores punta fina	2	1,32	1,32
TOTAL (\$)			438,88

Fuente: Elaborado por las autoras

FOTOGRAFÍA 7 PREPARACIÓN DE MEDIOS LÍQUIDOS Y SÓLIDOS Y ESTERILIZACIÓN



FOTOGRAFÍA 8 DILUCIONES SERIADAS



Análisis Físico-Químicos

FOTOGRAFÍA 9 MEDICIÓN DE TEMPERATURA, PH, % HUMEDAD



FOTOGRAFÍA 10 ACIDEZ LIBRE Y TOTAL



FOTOGRAFÍA 11 BENEFICIADO DEL CACAO



FOTOGRAFÍA 12 MÉTODOS DE FERMENTACIÓN



Montón

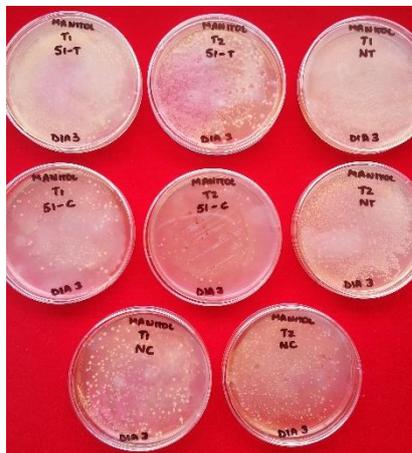
Cajón

Marquesina

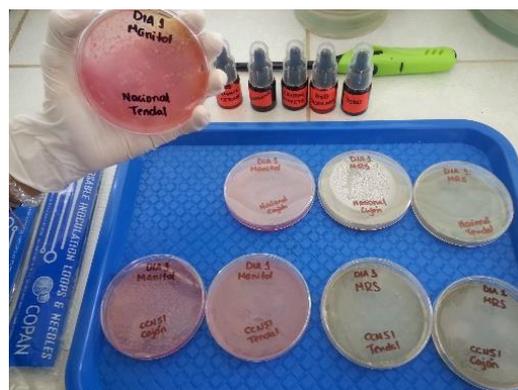
FOTOGRAFÍA 13 INOCULACIÓN DE MUESTRAS



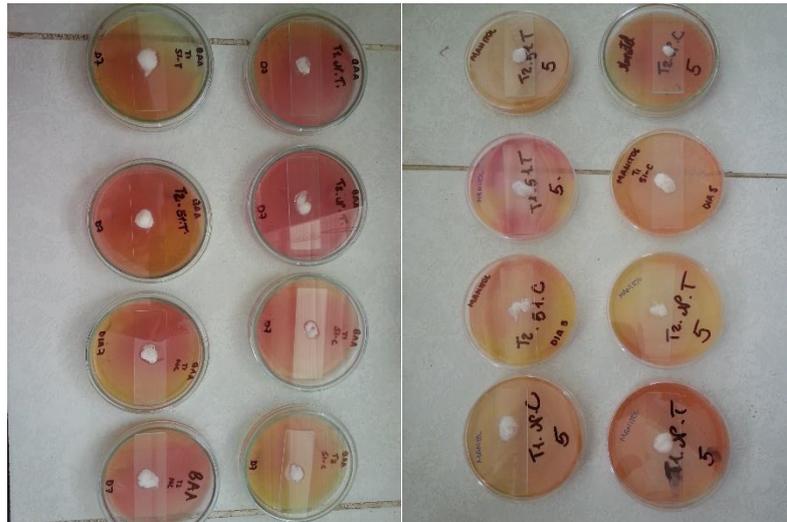
FOTOGRAFÍA 14 RECUENTO MICROBIANO (TPC)



FOTOGRAFÍA 15 TINCIÓN DE GRAM



FOTOGRAFÍA 16 PRUEBA DE CATALASA



FOTOGRAFÍA 17 IDENTIFICACIÓN MORFOLÓGICA



**FOTOGRAFÍA 18 PORCENTAJE DE GRANOS FERMENTADOS.
PRUEBA DE CORTE**

