



**Evaluación de un coctel microbiano utilizado como cultivo iniciador en la fermentación
de grano de cacao (*Theobroma cacao*) variedad nacional**

Haro Sevilla, Roberto José

Departamento de Ciencias de la Vida y la Agricultura

Carrera de Ingeniería Agropecuaria

Trabajo de titulación, previo a la obtención del título de Ingeniero Agropecuario

Falconí Saá, César Eduardo., PhD.

8 de Abril del 2021

Urkund AnalysisResult

AnalysedDocument: D99400234 Título del trabajo de titulación
Evaluación de un coctel microbiano utilizado como cultivo iniciador en la
fermentación de grano de cacao (Theobroma cacao) variedad nacional

aprobado.pdf (D54403984) Submitted: Fecha y hora 23.03.2021;
23.30

Submitted By: César E. Falconí Saá correo institucional cefalconi@espe.edu.ec
Significance: 5 %

Sources included in the report:

URL: [http://repositorio.uncp.edu.pe/bitstream/handle/UNCP/1899/Espinoza%20Osorio.pdf?se ...](http://repositorio.uncp.edu.pe/bitstream/handle/UNCP/1899/Espinoza%20Osorio.pdf?se...) 1

TESIS ACTV. MICROBIANA URKUND.docx

Document TESIS ACTV . MICROBIANA URKUND.docx (D26804144) 1

Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE / TESIS FINAL Roberto Haro_CFS-Urkund.docx

Document TESIS FINAL Roberto Haro_CFS-Urkund.docx (D99223302)

Submitted by: cefalconi@espe.edu.ec

Receiver: cefalconi.espe@analysis.orkund.com 1

URL: <http://unsworks.unsw.edu.au/fapi/datastream/unsworks:8348/SOURCE01?view=trueDutan>, 2

JESSICA ARANGO ANGARITA 2016.pdf

Document JESSICA ARANGO ANGARITA 2016.pdf (D76429600) 4

URL: [https://repositorio.unal.edu.co/bitstream/handle/unal/76069/TESIS%20ALEJANDRO%20PE ...](https://repositorio.unal.edu.co/bitstream/handle/unal/76069/TESIS%20ALEJANDRO%20PE...)

Fetchd: 1/8/2021 9:30:01 PM 10

URL: <https://www.revistaespirales.com/index.php/es/article/view/572/html>

Fetchd: 11/28/2020 12:09:17 PM 1

URL: <https://www.semanticscholar.org/paper/Fermentaci%C3%B3n-de-la-almendra-de-copoaz%C>

Firma:



Firmado electrónicamente por:
**CESAR EDUARDO
FALCONI SAA**

.....
PhD. Falconi Saá, César Eduardo
C. C. 06015564594
DIRECTOR



**DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA Y DE LA AGRICULTURA
CARRERA DE INGENIERÍA AGROPECUARIA**

CERTIFICACIÓN

Certifico que el trabajo de titulación, “**EVALUACIÓN DE UN COCTEL MICROBIANO UTILIZADO COMO CULTIVO INICIADOR EN LA FERMENTACIÓN DE GRANO DE CACAO (THEOBROMA CACAO) VARIEDAD NACIONAL**” fue realizado por el señor **Haro Sevilla, Roberto José** el cual ha sido revisado y analizado en su totalidad por la herramienta de verificación de similitud de contenido; por lo tanto cumple con los requisitos legales, teóricos, científicos, técnicos y metodológicos establecidos por la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE, razón por la cual me permito acreditar y autorizar para que lo sustente públicamente.

Sangolquí, 24 de marzo de 2021

Firma:



Firmado electrónicamente por:
**CESAR EDUARDO
FALCONI SAA**

.....
PhD. Falconi Saá, César Eduardo
C. C. 06015564594



DEPARTAMENTO DE LA VIDA Y DE LA AGRICULTURA

CARRERA DE INGENIERÍA AGROPECUARIA

RESPONSABILIDAD DE AUTORÍA

Yo/nosotros, **Haro Sevilla, Roberto José**, con cédula de ciudadanía n°1724169592, declaro que el contenido, ideas y criterios del trabajo de titulación: **“Evaluación de un coctel microbiano utilizado como cultivo iniciador en la fermentación de grano de cacao (*Theobroma cacao*) variedad nacional”** es de mi autoría y responsabilidad, cumpliendo con los requisitos legales, teóricos, científicos, técnicos, y metodológicos establecidos por la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE, respetando los derechos intelectuales de terceros y referenciando las citas bibliográficas.

Sangolquí, 12 de abril del 2021

Haro Sevilla, Roberto José

C.C.: 1724169592



DEPARTAMENTO DE LA VIDA Y DE LA AGRICULTURA

CARRERA DE INGENIERÍA AGROPECUARIA

AUTORIZACIÓN DE PUBLICACIÓN

Yo/ nosotros **Haro Sevilla, Roberto José** con cédula de ciudadanía n°1724169592, autorizo a la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE publicar el trabajo de titulación: **“Evaluación de un coctel microbiano utilizado como cultivo iniciador en la fermentación de grano de cacao (*Theobroma cacao*) variedad nacional”** en el Repositorio Institucional, cuyo contenido, ideas y criterios son de mi/nuestra responsabilidad.

Sangolquí, 12 de abril del 2021

Haro Sevilla, Roberto José

C.C.: 1724169592

Dedicatoria

A mis padres Verónica y Mario quienes siempre me apoyaron y guiaron para ser una persona correcta, a mis abuelitos Rosita, Guido, Emérita y José quienes han estado siempre pendientes de mí formación académica y personal, a mi tía Leticia quien me ha ayudado a alcanzar todos mis objetivos y a mi hermana Daniela quien estuvo siempre a mi lado motivándome.

Agradecimientos

A mi familia por estar siempre conmigo y por su apoyo incondicional.

A la Carrera de Agropecuaria (IASA I) y sus docentes por formarme como profesional.

A mi director de tesis, Dr. Cesar Falconí y a la Dra. Viviana Yáñez docente de la UDLA, quien con su experiencia y conocimiento me guiaron en la elaboración de este trabajo.

Al Ing. Darwin Claudio y a Belén Jaramillo por la ayuda y los buenos momentos compartidos durante este proceso.

A mis amigos y a las personas que siempre me han apoyado.

Índice de contenido

Carátula.....	1
Reporte Urkund.....	2
Certificación	3
Responsabilidad de autoría.....	4
Autorización de publicación.....	5
Dedicatoria.....	6
Agradecimientos.....	7
Índice de contenido	8
Índice de tablas	13
Índice de figuras	14
Resumen	15
Abstract.....	16
Capítulo I.....	17
Introducción	17
Antecedentes	17
Justificación e importancia del tema	18

Planteamiento del problema.....	20
<i>El problema</i>	20
<i>Los efectos</i>	20
<i>Las causas</i>	21
Objetivos	22
<i>Objetivo general</i>	22
<i>Objetivos específicos</i>	22
Hipótesis	22
<i>Hipótesis nula</i>	22
<i>Hipótesis alterna</i>	22
Capítulo II.....	23
Marco teórico	23
El cacao.....	23
<i>Origen, taxonomía</i>	23
<i>Características botánicas y requerimientos climáticos y edáficos</i>	24
Cosecha y fermentación del cacao	25
<i>Cosecha</i>	25

	10
<i>Fermentación</i>	26
Aspectos microbiológicos de la fermentación de la almendra de cacao	29
<i>Primera fase</i>	29
<i>Segunda fase</i>	30
<i>Tercera fase</i>	31
<i>Cuarta fase</i>	31
Bioconversión dentro de las almendras de cacao	32
Rol de cultivos iniciadores en la fermentación de cacao	33
Proceso de formación de precursores del sabor en cacao	36
<i>Desarrollo de precursores de sabor a cacao</i>	36
Capítulo III	40
Metodología	40
Preparación del inóculo	40
Ubicación geográfica del ensayo	40
Inoculación y muestreo de almendras durante la fermentación	41
Temperatura, ph y contenido de agua	43
Características bioquímicas	44

	11
Concentración de azúcares	45
Concentración de ácidos orgánicos	45
Análisis de datos	46
Contenido total de polifenoles (tpc o ctp)	46
Análisis de microorganismos	47
Cuantificación de la dinámica poblacional	47
Prueba de corte	47
Diseño experimental	48
Análisis estadístico	49
Capítulo IV	50
Resultados y Discusión	50
Temperatura, ph y contenido de humedad	50
Contenido de azúcares	51
Dinámica poblacional de microorganismos	53
Contenido de ácidos orgánicos	57
Prueba de corte	61
Análisis de correlación	62

	12
Capítulo V	63
Conclusiones y Recomendaciones	63
Conclusiones	63
Recomendaciones	64
Bibliografía	66

Índice de Tablas

Tabla 1 <i>Promedio \pm desviación estándar de ph y temperatura en almendras de cacao durante la fermentación.....</i>	51
--	----

Índice de Figuras

Figura 1	<i>Corte transversal de la almendra de cacao (T. cacao).....</i>	38
Figura 2	<i>Zona de experimento de campo.</i>	41
Figura 3	<i>Llenado de los sacos de yute con cacao nacional para su posterior fermentación... ..</i>	42
Figura 4	<i>Toma de muestras de cacao en durante el proceso de fermentación.....</i>	43
Figura 5	<i>Proceso de secado de las almendras de cacao para determinar su % de humedad</i>	44
Figura 6	<i>Croquis experimental.....</i>	49
Figura 7	<i>Contenido de azúcares en las almendras de cacao durante el proceso fermentativo.....</i>	53
Figura 8	<i>Dinámica poblacional de microorganismos en el proceso de fermentación</i>	56
Figura 9	<i>Contenido de ácidos en las almendras de cacao durante el proceso fermentativo ..</i>	59
Figura 10	<i>Contenido de polifenoles totales durante la fermentación de almendras de cacao ..</i>	60
Figura 11	<i>Porcentaje de fermentación de las almendras de cacao a las 96 horas de fermentación.....</i>	61

Resumen

El cacao (*Theobroma cacao*) fino de aroma es uno de los productos de exportación más icónicos del país, representado el 63% de la producción mundial, sin embargo, procesos tan importantes como la fermentación, la cual influye en gran medida en el desarrollo de las características organolépticas del chocolate, no se han realizado avances significativos para la optimización de este proceso. El estudio y uso de consorcios microbianos o cultivos iniciadores en la fermentación del cacao se ha venido desarrollando desde hace más de 20 años en otros países, los cuales buscan mejorar las propiedades del haba de cacao fermentado en las características organolépticas, disminución de la producción de ocratoxinas por parte de hongos filamentosos, disminución del tiempo de fermentación, entre otras. Con todos estos antecedentes e información recabada del proceso fermentativo se propone este trabajo cuyo objetivo es el analizar los efectos que tiene la adición de un consorcio microbiano al inicio del proceso fermentativo, basado en dos levaduras (*Torulaspota delbrueckii* y *Hanseniaspora uvarum*), una bacteria ácido láctica o BAL (*Lactobacillus plantarum*) y una bacteria ácido acética o BAA (*Acetobacter ghanensis*) sobre la temperatura, pH, porcentaje de humedad, variables bioquímicas como contenido de azúcares, ácidos orgánicos, polifenoles, la dinámica poblacional microbiana y porcentaje de fermentación. Se observó que la adición de este inóculo tuvo efecto en el contenido de algunos azúcares y ácido durante la fermentación, también se observó un aumento considerable en la población de levaduras y BAA (0,92 y 1,69 unidades logarítmicas respectivamente) y una disminución significativa en la población de hongos filamentosos (2,1 unidades logarítmicas), dándonos al final un 77% de almendras bien fermentadas.

Palabras clave: *Cacao, Fermentación, Consorcio microbiano, Bioquímica, Dinámica poblacional*

Abstract

Fine aroma cocoa (*Theobroma cacao*) is one of the country's most iconic export products, representing 63% of world production, however, processes as important as fermentation, which greatly influences the development of the organoleptic characteristics of chocolate, no significant progress has been made to optimize this process. The study and use of microbial consortia or starter cultures in cocoa fermentation have been developing for more than 20 years in other countries, which seek to improve the properties of the fermented cocoa bean in the organoleptic characteristics, decrease the production of ochratoxins by filamentous fungi, decreased fermentation time, among others. With all these antecedents and information gathered from the fermentation process, this work is proposed, the objective of which is to analyze the effects of the addition of a microbial consortium at the beginning of the fermentation process, based on two yeasts (*Torulaspora delbrueckii* and *Hanseniaspora uvarum*), a lactic acid bacterium. or BAL (*Lactobacillus plantarum*) and an acetic acid bacterium or BAA (*Acetobacter ghanensis*) on temperature, pH, percentage of humidity, biochemical variables such as the content of sugars, organic acids, polyphenols, microbial population dynamics and percentage of fermentation. It was realized that the addition of this inoculum had an effect on the content of some sugars and acid during fermentation, there can also be a considerable increase in the population of yeasts and BAA (0.92 and 1.69 logarithmic units respectively) and a decrease significant in the population of filamentous fungi (2.1 logarithmic units), giving us at the end 77% of well-fermented almonds.

Key words: *Cocoa, Fermentation, Microbial consortium, Biochemistry, Population dynamics*

Capítulo I

Introducción

Antecedentes

El cacao (*Theobroma cacao*) es uno de los principales productos de exportación tradicional ecuatoriana. Según el Instituto Nacional de Estadística y Censos (INEC), el sector cacaotero (dedicado al cacao) contribuye aproximadamente con el 5% de la población económicamente activa (PEA) y el 15% de la PEA rural, convirtiéndose en base fundamental de la economía familiar del litoral ecuatoriano, las estribaciones de las montañas de los Andes y la Amazonía ecuatoriana. Ecuador ocupa el tercer lugar de productores de almendra de cacao a nivel mundial, representando así el 7% de la producción mundial total y lidera la producción de la variedad de cacao fino de aroma con una participación del 63% a nivel mundial. La Unión Europea y Estados Unidos constituyen los principales destinos de exportación (Anecacao 2019; CFN 2018). Por esta razón es indispensable que, la cosecha, y la poscosecha (fermentación y secado) se la realicen de la mejor y más eficiente forma, generando así un producto final de calidad, que podría ser comercializado a un mejor precio. Uno de los dos pasos más importantes para desarrollar los sabores de chocolate deseados en un grano de cacao es la fermentación y secado, en este proceso las semillas cosechadas pueden someterse inmediatamente a una fermentación natural durante la cual la acción microbiana sobre la pulpa mucilaginosa produce etanol y ácidos, además de liberar calor. La fermentación de la almendra de cacao generalmente toma de 5 a 10 días y es iniciada por microorganismos autóctonos de la zona, que se presentan naturalmente en los sitios de fermentación, habitantes en superficies de las vainas y el suelo, donde se han encontrado levaduras, bacterias ácido acéticas (AAB), bacterias ácido lácticas (LAB), bacilos (quienes interaccionan entre sí desencadenando muchos cambios físicos

y reacciones químicas que promueven características bioquímicas prometedoras en las almendras) y hongos filamentosos (que generan micotoxinas como la ocratoxina y citrinina) que disminuyen la calidad del grano de cacao (Fowler y Coutel 2017; Ganeswari et al. 2015; Nielsen 2006; Schwan y Wheals 2004).

Para mejorar la calidad de la fermentación recientes estudios han incorporado cultivos iniciadores de microorganismos que podrían realizar correctamente el proceso de fermentación de cacao, por lo cual deberían estar compuestos por al menos una cepa de cada grupo de microorganismos (levadura, LAB y AAB). Sin embargo, es necesario seleccionar la cepa de LAB adecuada para evitar la sobreproducción de ácido láctico y su impacto negativo en la calidad del grano de cacao (Figuroa et al. 2019; Schwan y Wheals 2004).

Justificación e importancia del tema

Durante el proceso de fermentación del grano de cacao, las comunidades de microorganismos que aparecen y se desarrollan, juegan papeles de suma importancia: siendo las levaduras las que se encargan de eliminar la pulpa que rodea a la almendra fresca, así también actúan des-polimerizando o rompiendo la pectina, mientras que en condiciones anaeróbicas (sin oxígeno) del proceso, actúan fermentando los azúcares para producir etanol. Otro grupo de microorganismos importantes son las bacterias, estas fermentan los azúcares, produciendo: ácido acético, ácido láctico y manitol. Si no se contara con la importante participación de estos microorganismos no podría ocurrir una correcta fermentación del grano de cacao, por tanto no se lograría tener el sabor deseado, característico de un chocolate de calidad (El Salous et al. 2019)

En la fermentación del grano de cacao, dos especies bacterianas: *Lactobacillus fermentum* y *Acetobacter pasteurianus* pueden considerarse buenos candidatos para elaborar cultivos iniciadores, específicamente *Lb. Fermentum* que tiene características como: el metabolismo heterofermentativo, la capacidad de crecimiento de fructosa, la conversión de citrato, la producción de manitol y el calor ácido, y la tolerancia al etanol, características que son deseadas de cepas de arranque en la fermentación de cacao, así también especies de *Bacillus*, que han demostrado un efecto positivo sobre la fermentación del cacao (Figueroa et al. 2019).

La producción de cacao en el país es fundamental ya que genera plazas de empleo e ingresos a miles de familias, además proporciona productos de exportación, se debe siempre tener en cuenta el cumplimiento de estándares de calidad como las normas ecuatorianas INEN y en el caso de productos de exportación estándares europeos o estadounidenses o algún otro, según el país, ya que en estos destinos el suministro de cacao debe ser sostenible, homogéneo y de calidad, esto se lo puede lograr al tener un correcto proceso fermentativo de la almendra de cacao. Por lo tanto, este proyecto tiene la finalidad de proporcionar información adicional acerca del uso de cultivos iniciadores de microorganismos a base de especies autóctonas de la zona, inoculadas al inicio de la fermentación, con el fin de mejorar este proceso, ya sea disminuyendo el tiempo de fermentación, aumentando las concentraciones de ácidos orgánicos, azúcares, etanol, contenido de polifenoles y posiblemente disminuyendo la aparición de hongos filamentosos, obteniendo de esta manera una mejora en las propiedades de sabor y aroma (Zambrano 2018).

Planteamiento del problema

El problema

Los granos de cacao son muy susceptibles a la contaminación por microorganismos patógenos o presentar una baja cantidad de microorganismos promotores o iniciadores de fermentación debido a factores ambientales o un manejo inadecuado, esto hace que se vean afectados parámetros internos del grano de cacao, como el pH, la actividad del agua y la concentración de diversos ácidos orgánicos, azúcares, etanol y polifenoles, los mismos que se forman durante el proceso de fermentación de la almendra y que confieren al cacao propiedades organolépticas deseadas. Además, estos contaminantes alteran o deterioran las propiedades sensoriales, por lo que la presencia de hongos filamentosos en el cacao y en el chocolate también es motivo de preocupación debido a la posibilidad de formación de micotoxinas principalmente del género *Aspergillus* y *Penicillium*. De la misma manera si no hay una buena cantidad de microorganismos promotores de la fermentación este proceso puede durar más tiempo hasta obtener una almendra lista para pasar a secado (Copetti, et al. 2014; Ramos et al. 2016).

Los efectos

El aumento de tiempo de fermentación de las almendras de cacao y la presencia de una gran cantidad de hongos filamentosos del género *Aspergillus* y *Penicillium*, pueden inducir a una mayor presencia de micotoxinas y a una disminución en la población de microorganismos que aportan positivamente en el proceso de fermentación de la almendra de cacao. Actualmente se ha observado que el consumo de chocolate con altos porcentajes de cacao, se ha elevado, esto quiere decir que cada

vez se necesitará optimizar el proceso de fermentación y secado del producto base, a su vez podría elevar la exposición a contaminantes alimentarios como las ocratoxinas y aflatoxinas debido a procesos de fermentación y secado inadecuados, a su vez estos pueden alterar las propiedades organolépticas y la calidad requerida para exportación y comercialización en el mercado internacional, por lo que es importante controlar su aparición (CFN 2018; Copetti, et al. 2014).

Las causas

La pérdida de las propiedades organolépticas del cacao en gran medida se debe a la presencia de microorganismos patógenos como los hongos filamentosos, los mismos que producen micotoxinas que alteran el sabor del cacao. Hay cuatro categorías de hongos que contaminan los productos alimenticios: hongos de campo, hongos de almacenamiento, hongos invasores y hongos contaminantes. La fermentación imperfecta o el secado lento hacen que este tipo de hongos crezcan rápidamente. Los factores que influyen en el crecimiento de hongos y la producción de toxinas, pueden ser entre otros, las características del contenedor (deficiente aireación), la influencia de la atmósfera (CO₂ y O₂), temperatura (25°C es la temperatura óptima para producir una toxina) y la influencia de la humedad (HR > 80% es la humedad ideal para una correcta fermentación). La contaminación por ocratoxina (y probablemente micotoxinas como tales) puede evitarse o al menos minimizarse si se realiza un buen procesamiento del cacao, especialmente en la etapa de fermentación y secado (Hatmia et al. 2015; Nielsen et al. 2013).

Objetivos

Objetivo General

Evaluar un coctel microbiano como cultivo iniciador en la fermentación del grano de cacao (*Theobroma cacao*) variedad Nacional.

Objetivos Específicos

Recolectar y analizar datos de pH, temperatura, humedad y dinámica poblacional durante el proceso de fermentación de las almendras de cacao variedad Nacional.

Analizar el contenido de ácidos orgánicos, azúcares, polifenoles totales en distintas etapas del proceso de fermentación.

Evaluar el porcentaje de fermentación de las almendras de cacao a las 96 horas de fermentación.

Hipótesis

Hipótesis nula

La adición de un coctel microbiano no disminuye la población de hongos filamentosos y la cantidad de ácidos orgánicos y azúcares durante el proceso de fermentación de almendras de cacao variedad nacional.

Hipótesis alterna

La adición de un coctel microbiano disminuye la población de hongos filamentosos y aumenta la cantidad de ácidos orgánicos y azúcares durante el proceso de fermentación de almendras de cacao variedad nacional.

Capítulo II

Marco Teórico

El Cacao

Origen, Taxonomía

El árbol tropical *Theobroma cacao* L., pertenece a la familia Sterculiaceae, orden Malvales. En la antigua América Central, los mayas y los aztecas solían cultivar árboles de cacao para usar sus semillas para preparar "chocolatl", la primera bebida a base de chocolate. Los árboles de cacao se encontraron creciendo a la sombra de un jardín de bosque maya "típico" compuesto por una mezcla de especies nativas útiles como *Pouteria mammosa* (mamey), *Ficus* sp., *Chrysophyllum cainito* (caimito), *Annona reticulata* (anona colorada), *Carica papaya* (papaya), entre las especies nativas, y *Cocos nucifera* (coco), *Citrus* spp. (naranjas y limones), y *Musa paradisiaca* (plátano) como la principal especie introducida (Predan et al. 2019).

Según Bhattacharjee y Akoroda (2018) y, el cacao *Theobroma cacao* L., tiene la siguiente clasificación taxonómica:

Reino: Plantae

Subreino: Tracheobionta

División: Magnoliophyta

Clase: Magnoliopsida

Subclase: Dilleniidae

Orden: Malvales

Familia: Malvaceae / Esterculiaceae

Género: Theobroma

Especie: *Theobroma cacao*

La información oficial que se tienen sobre la producción de cacao en el Ecuador data de 1780, más de 200 años produciéndolo. La variedad original de la zona conocida como "Nacional" que aún se cultiva y tiene gran importancia en el país, se mantuvo como variedad exclusiva hasta 1890 aproximadamente, es entonces cuando fue introducida a la provincia de Los Ríos una variedad forastera, conocida como "cacao venezolano" (INIAP 1994).

Características botánicas y requerimientos climáticos y edáficos

Se caracteriza por ser un pequeño árbol tropical y subtropical perenne originado en los bosques lluviosos neotropicales, su altura puede variar entre 5 y 15 m. Para crecer adecuadamente, el árbol de cacao requiere clima cálido y húmedo, con temperaturas que oscilan entre 24 a 28 ° C (máximo de 32 ° C y mínimo de 18 ° C), humedad relativa no mayor al 60% (considerando luminosidad y temperatura), precipitaciones mínimas anuales de 1250 mm y máximo de 3000 mm, elevaciones hasta los 600 msnm, aunque en Ecuador se desarrolla de manera normal en altitudes mayores a los 1000 msnm hasta los 1400 msnm, con vientos de 1-2 m/seg (AGROCALIDAD 2013; INIAP 1994; Predan et al. 2019; Torres 2012).

Es un cultivo que presenta sensibilidad a la luz y al viento, generalmente crece bajo las llamadas "madres de cacao", que son básicamente cocoteros o bananos, y para su desarrollo necesita 2000 horas luz al año. En la naturaleza, los árboles de cacao son polinizados por mosquitos, y solo alrededor del 5% de las flores reciben suficiente polen para comenzar el desarrollo de la fruta. El árbol florece cada

temporada. Un árbol maduro puede producir 10 000 flores durante un año, lo que puede dar como resultado solo de 10 a 50 vainas (mazorcas). Las flores de cacao se agrupan en racimos que surgen directamente del tronco. Los frutos maduros se parecen a un melón y generalmente tienen entre 15 y 25 cm de largo y 7-10 cm de ancho. La fruta o "vaina de cacao", tiene un color rojo a marrón específico y una superficie cubierta a lo largo de perillas y líneas (AGROCALIDAD 2013; Predan et al. 2019; Dand 2011; Torres 2012).

El suelo ideal para el cultivo de cacao depende en gran medida de las condiciones climáticas predominantes, particularmente la cantidad y distribución de las precipitaciones. Demasiada lluvia en un suelo con mal drenaje puede causar que el sistema de raíces respire, aunque pueden resistir a las inundaciones, los árboles de cacao morirán si estas condiciones persisten. Del mismo modo, el cacao es intolerante a las condiciones de sequía y, por lo tanto, un suelo arenoso que tiene poca retención de agua estresará al árbol. La profundidad, el tipo, la acidez y la cantidad de material orgánico en el suelo son factores que contribuyen a su óptimo cultivo. Los suelos para su correcto desarrollo en lo posible deben ser terrenos con una ligera pendiente, francos, profundos, con buen drenaje, alto contenido de materia orgánica y su pH debe estar entre 6.0-6.5, estas condiciones aseguran un rendimiento adecuado (AGROCALIDAD 2013; Dand 2011).

Cosecha y fermentación del cacao

Cosecha

El árbol de cacao (*T. cacao*) normalmente comienza a producir mazorcas después de 3 años, y el rendimiento alcanza su máximo después de 8 o 9 años. Los árboles dan flores simultáneamente, se desarrollan bayas y frutas maduras. Las

mazorcas se desarrollan en el tronco y ramas, que maduran en unos 5-6 meses después de la fertilización y se vuelven rojas, amarillas o anaranjadas. Las frutas maduras (vainas o mazorcas) surgen directamente del tallo del árbol de cacao, la parte que recubre las semillas (pericarpio) es gruesa dentro de la cual se desarrollan aproximadamente 30-40 almendras (semillas), estas están formadas por dos cotiledones (donde se acumulan almidones, proteínas, lípidos y taninos) y su respectivo embrión el cual generará la futura planta, y están recubiertas por una capa llamada testa, la cual se encuentra envuelta en una pulpa dulce, blanca y mucilaginosa que comprende aproximadamente el 40% del peso fresco de la semilla. Las mazorcas son luego abiertas el mismo día o después de unos días para colectar una cantidad suficiente para la etapa de fermentación, ya que almacenar las mazorcas durante algunos días antes de abrirlas se considera beneficioso para la fermentación, ya que da como resultado un aumento más rápido de la temperatura durante la fermentación, y por lo tanto una fermentación más rápida, presumiblemente porque la sacarosa se convierte en glucosa y fructosa; se retiran los granos de las mazorcas. Para abrir las mazorcas se utiliza generalmente un machete, y luego se va sacando las almendras y la placenta. El uso de un cuchillo puede dañar algunas almendras y dar la oportunidad a los mohos para infectar los cotiledones, lo que da como resultado una grave pérdida en la calidad (Dand 2011; Nielsen 2006; Nigam y Singh 2014; Schwan y Wheals 2004).

Fermentación

La fermentación tiene por objetivo separar el mucílago del cacao, fijar el sabor y el aroma, matar el embrión de la semilla y finalmente dar al cacao el sabor a chocolate que tanto apetece el comprador (Echeverri 2013).

Uno de los dos pasos más importantes para desarrollar los sabores de chocolate deseados en un grano de cacao es la fermentación y secado (el otro es el tostado de la almendra), en este proceso las semillas cosechadas pueden someterse inmediatamente a una fermentación natural durante la cual la acción microbiana sobre la pulpa mucilaginosa produce etanol y ácidos, además de liberar calor. La fermentación generalmente toma de 5 a 10 días, las almendras de cacao Forastero requieren tiempos de fermentación más largos que las almendras de cacao Criollo, pero siempre debe controlarse cuidadosamente, ya que tiempos de fermentación más largos (almendras sobrefermentadas) conducen a una acidez excesiva, así como a sabores desagradables. La mayor parte del proceso fermentativo ocurre bajo condiciones anaeróbicas, aunque se realiza una mezcla o movimiento de las almendras periódicamente, donde se añade oxígeno, permitiendo que también ocurra una fermentación aeróbica (Fowler y Coutel 2017; Hartel y Hofberger 2018; Schwan y Wheals 2004).

El método de procesamiento de la almendra generalmente dependerá de cada país en el cual se desarrolle en el caso de Ghana, Nigeria y Costa de Marfil, generalmente se realiza en montones y bandejas, países como Brasil, Malasia en cajones, mientras que en Ecuador se lo realiza en sacos, cajas y plataformas o marquesinas. Las almendras de cacao pueden apilarse y cubrirse con hojas (plátano) o apilarse en cajas con agujeros en el fondo para permitir el drenaje. Se necesita una masa suficiente de almendras (a veces cientos de kilogramos) para garantizar la acumulación de calor necesario durante la fermentación. En las plantaciones comerciales, la fermentación normalmente se la realiza en grandes cajas de madera que típicamente contienen 1–2 toneladas métricas de almendras húmedas/frescas,

estas cajas deben estar diseñadas para drenar la pulpa licuada y permitir la entrada de aire. Esto se logra por medio de pequeños agujeros en el fondo de la caja o con tablas con un espacio entre ellas de unos 6 mm, estas cajas normalmente son de 1.0–1.5m de ancho y pueden tener hasta 1m de profundidad (se prefieren pocos volúmenes de almendra al comienzo de la fermentación, para promover una buena aireación). Para aumentar la aireación y garantizar la uniformidad de la fermentación, los granos generalmente se transfieren de una caja a otra todos los días, para facilitar este proceso las cajas se ubican en un sistema de gradas (de Melo et al. 2016; Fowler y Coutel, 2017; Schwan y Wheals 2004).

La fermentación de la almendra de cacao es iniciada por microorganismos autóctonos de la zona, que se presentan naturalmente en los sitios de fermentación, superficies de las vainas y el suelo, donde se han encontrado levaduras, bacterias ácido acéticas (BAA), bacterias ácido lácticas (BAL), bacilos y hongos filamentosos. Estos microorganismos interactúan entre sí desencadenando muchos cambios físicos y reacciones químicas que promueven características bioquímicas prometedoras de las almendras. Por ejemplo, la bioconversión de azúcar (dentro del mucílago) en componentes orgánicos intermedios como etanol, ácido láctico, ácido acético y otros ácidos orgánicos. Esta intensa actividad microbiana genera metabolitos y condiciones que matan las almendras, debido a una serie de reacciones bioquímicas dentro de las almendras que inhiben su germinación, así mismo se producen varias reacciones enzimáticas que contribuyen a la formación del sabor y color deseables. El color de las almendras se transformará de un tono púrpura o violeta a un tono café-marrón, esta transformación o cambio es usado como referencia para saber de su etapa de madurez. Además, estas transformaciones bioquímicas que ocurren de forma espontánea al

interior de la almendra también reducen su amargor y astringencia. Los enfoques utilizados en la fermentación espontánea de los granos de cacao difieren entre los países productores según las preferencias locales, por ejemplo, los métodos utilizados, la duración de la fermentación, la selección de mazorcas o granos y los tratamientos poscosecha que tendrán un impacto significativo en la calidad de los productos finales (de Melo et al. 2016; Ganeswari et al. 2015).

Aspectos microbiológicos de la fermentación de la almendra de cacao

Durante el proceso fermentativo de manera general se habla de fases según los cambios en la población de diferentes tipos microorganismos:

Primera fase

La almendra al inicio de la fermentación está recubierta por la pulpa o mucílago con altos contenidos de carbohidratos y un pH bajo (<4). Estas condiciones iniciales hacen que el crecimiento de las poblaciones de levaduras sea mayor. Generalmente en esta fase se encuentran entre 5 y 6 especies distintas de levaduras, siendo especies del género *Hanseniaspora sp.*, las levaduras que se encuentran en mayor cantidad durante las primeras 24 horas, mientras que durante las 36-38 horas dominan especies como *Saccharomyces cerevisiae* y *Pichia sp.*, mismas que se observan durante toda la fermentación. Estos microorganismos mediante procesos enzimáticos convierten los azúcares presentes en el mucílago en ácidos y etanol, degradan la pectina, modificando de esta manera la textura del grano, hecho que genera una disminución de la acidez (pH 4.0), esto causa que en el segundo día generalmente muera el embrión de la almendra, causado por el ácido acético y alcohol, todo este consorcio de levaduras comienzan a consumir grandes cantidades de oxígeno, llevando el proceso a un

ambiente con muy poco o nulo contenido de este, lo que posteriormente favorece el desarrollo de bacterias ácido lácticas o BAL (Fowler 2009; Wachter 2011).

Segunda fase

Las bacterias del ácido láctico están presentes al comienzo de la fermentación, aunque las levaduras son dominantes. La actividad de la levadura se inhibe por la concentración de alcohol, aumentando el pH por mayor aireación. Después de 48-96 h, las condiciones se vuelven más favorables para bacterias del ácido láctico, que luego dominan. En esta fase están presentes condiciones que favorecen la reproducción de las poblaciones de BAL, las cuales se encargan de fermentar la mayoría de los carbohidratos residuales (glucosa, fructosa, sacarosa) de la fase anterior a la vez que consumen ácido cítrico para su transformación en ácido acético. Se han encontrado dentro de pilas de fermentación especies del géneros *Lactobacillus* principalmente *Lb. fermentum*, *Lb. plantarum*, los cuales se han descrito como especies propias del proceso fermentativo. Las bacterias del ácido láctico convierten una amplia gama de azúcares y algunos ácidos orgánicos (por ejemplo, ácidos cítrico y málico) a ácido láctico y dependiendo del tipo de *Lactobacillus* a ácido acético, etanol y dióxido de carbono. En esta fase también se encuentran las levaduras, las cuales mediante enzimas pectinolíticas, disminuyen la viscosidad característica de la pulpa, favoreciendo la entrada de aire, creando así un ambiente más aerobio y con un pH mayor, ya que como se mencionó hay consumo de ácido cítrico, este ambiente incentiva el desarrollo de las poblaciones de bacterias ácido acéticas o BAA (Nigam y Singh 2014; Salazar 2017; Wachter 2011).

Tercera fase

Esta fase ocurre generalmente a partir de las 72, donde se da una transformación de los productos de la fermentación, por parte de las BAA, que aunque se encuentran durante todo el proceso, por las mejores condiciones comienzan a actuar al final de la fermentación, estas bacterias transforman el etanol que generaron las distintas levaduras en las anteriores fases en ácido acético, proceso similar que ocurre en la elaboración de vinagres. Durante la transformación de etanol a ácido acético ocurren reacciones exotérmicas que producen calor ($>40^{\circ}\text{C}$), además estos productos se penetran al interior de las almendras y junto con las altas temperaturas, provocan la muerte del embrión, inhabilitándolo para poder germinar. Se ha encontrado que las principales BAL aisladas del proceso fermentativo fueron especies como *Acetobacter aceti*, *Acetobacter pasteurianus* y *Gluconobacter oxydans* en distintas fases y tiempos (Fowler 2009; Nielsen 2006).

Cuarta fase

Esta ocurre durante a partir de las 48-60 horas, donde se han observado bacterias del género *Bacillus*, estos microorganismos aumentan con la presencia de oxígeno en métodos donde se voltea la pila de fermentación se favorece su presencia en la superficie de la masa, se ha reportado que especies como *B.subtilis*, *B. pumilus*, *B. megaterium* y *B. licheniformis*. Otro factor que favorece su multiplicación es el aumento de temperatura. Este género es conocido ya que producen enzimas que catalizan diversas reacciones, como las proteolíticas, cuya función es degradar las proteínas lipolíticas que actúan sobre las grasas, aunque no está completamente estudiado se han reportado que esto genera sabores y olores desagradables, pero también otras reacciones podrían contribuir de manera positiva sobre el sabor, debido a

la producción de diversos compuestos saborizantes y ácidos orgánicos, como 2,3-butanodiol (Ardhana y Fleet, 2003). En algunos estudios diversos autores han reportado la presencia de *Tatumella*, *Pantoea* y *Erwinia sp.*, bacterias que no se habían visto en la fermentación del cacao y no se sabe cómo podría influir su presencia en el proceso de fermentación, generalmente estas son fitopatógenas, pero también tienen una alta afinidad al consumo de citrato (Nigam y Singh 2014; Ortansa 2019; Wachter 2011).

Bioconversión dentro de las almendras de cacao

El etanol, el ácido acético y el calor producido durante la fermentación del cacao en grano penetran a través de la testa de los granos de cacao en sus cotiledones y matan a su embrión. La testa como barrera biológica en realidad controla la cinética de los procesos de fermentación y difusión concomitantes dentro y fuera de las almendras; al mantenerlo cerrado durante la fermentación, las grasas de los cotiledones de la almendra no se ven afectadas y se evita la infección de los frijoles. Aunque el ácido acético y el calor contribuyen principalmente a la muerte del embrión, el etanol también puede ser responsable de la activación de ciertas enzimas de cotiledones de granos de cacao. Es importante tener en cuenta una disminución del pH del cotiledón y el aumento de concentraciones de ácido acético causan la destrucción de las membranas internas de los cotiledones de las almendras (en particular material de reserva y células de pigmento), durante el curso de fermentación, para que los sustratos endógenos y las enzimas puedan migrar y mezclarse (De Vuyst y Weckx 2016).

El alcance de las conversiones bioquímicas depende de la velocidad, la duración y la intensidad de la disminución del pH, el aumento de la temperatura y la liberación de sudoración. Estos implican la hidrólisis de sacarosa por la invertasa, la degradación de la proteína de almacenamiento de vicilina (globulina) por las proteasas, y la división de

terpenos unidos a antocianinas y glucósidos por glucosidasas durante las fases anaeróbicas y microaerofílicas del proceso de fermentación del grano de cacao, así como la actividad de polifenol oxidasa que tiene lugar durante su fase aeróbica, como resultado, se producen importantes precursores de sabor, dado por la reducción de azúcares, péptidos hidrofílicos y aminoácidos hidrofóbicos, y se produce un blanqueamiento del color púrpura y / o coloración marrón de los granos de cacao (De Vuyst y Weckx 2016).

Además, estos precursores son necesarios para desarrollar aún más el color y el sabor durante el secado de los granos fermentados y para permitir reacciones químicas en el tostado posterior de los granos secos fermentados, en particular las reacciones de degradación de Maillard y Strecker que liberan una amplia gama de aromas, compuestos activos como aldehídos, pirazinas, furanos, cetonas, pirrol, ésteres, ácidos y alcoholes. Al mismo tiempo que el ácido acético penetra en los granos, los compuestos como alcaloides y polifenoles se filtran de los granos fermentados a la pulpa circundante, reduciendo así su amargor y astringencia de los granos fermentados (De Vuyst y Weckx 2016).

Rol de cultivos iniciadores en la fermentación de cacao

Durante el proceso de fermentación de los granos de cacao, las comunidades de microorganismos que aparecen y se desarrollan juegan papeles de suma importancia: siendo las levaduras las que eliminan toda la pulpa que se encuentra rodeando a las almendras frescas de cacao, así también actúan des-polimerizando o rompiendo la pectina, mientras que en condiciones anaeróbicas (sin oxígeno) del proceso, fermentan los azúcares para producir etanol. Otro grupo de microorganismos importantes son las bacterias, estas fermentan los azúcares, produciendo: ácido acético, ácido láctico y

manitol. Si no se contara con la importante participación de estos microorganismos no podría ocurrir una correcta fermentación de los granos de cacao, de esta manera no se obtendría el sabor deseado, característico del chocolate de calidad (El Salous et al. 2019)

La primera evaluación del rendimiento de un cultivo de iniciación, conformado por: *S. cerevisiae var. chevalieri*, *Lb. lactis*, *Lb. plantarum*, *A. aceti*, y *G. oxydans subsp.* que se hicieron para granos de cacao, concluyó que los cultivos iniciadores podrían ser una opción viable para obtener un proceso de fermentación confiable y en consecuencia, características deseables del chocolate (cabe señalarse que el miembro del género *Gluconobacter* también ha sido conocido como productor de ácidos y sabores desagradables y ha causado un desarrollo tardío de las levaduras en la fermentación del cacao). En otros estudios al utilizar cultivos iniciadores de *S. cerevisiae* y *T. delbrueckii*, se encontró un impacto positivo en el perfil aromático, también se ha podido observar diferencias significativas entre la composición de los compuestos orgánicos volátiles (COV). Además de los microorganismos más estudiados también se ha demostrado que los microorganismos *Bacillus pumilus* y *Pichia mexicana* proporcionan un grado aceptable de fermentación. Dentro de la diversidad microbiana, dos especies bacterianas: *Lb. fermentum* y *A. pasteurianus* pueden considerarse buenos candidatos para cultivos iniciadores, específicamente *Lb. Fermentum* que tiene características que favorecen: el metabolismo heterofermentativo, la capacidad de crecimiento de fructosa, la conversión de citrato, la producción de manitol y el calor ácido, y la tolerancia al etanol, que son características deseables de cepas de arranque en la fermentación de cacao (Figuroa et al. 2019).

En investigaciones realizadas por da Veiga *et al.* (2017), al utilizar un cóctel de microorganismos como cultivo iniciador en la fermentación de las almendras de cacao maduras del híbrido de cacao PH15, y evaluar su influencia en las comunidades microbianas presentes en el proceso de fermentación en los compuestos involucrados durante la fermentación y para realizar la caracterización sensorial de chocolate, se pudo observar que al realizar la inoculación de microorganismos (*Saccharomyces cerevisiae* UFLA CCMA 0200, *Lactobacillus. plantarum* CCMA 0238 y *A. pasteurianus* CCMA 0241) como cultivo iniciador se aceleró el proceso de fermentación. Las comunidades bacterianas y de levadura fueron diferentes según cada proceso (PH15 Inoculado y PH15 No Inoculado), pero las bacterias (*Gluconobacter oxydans*, *Lactobacillus plantarum*, *Acetobacter pasteurianus*, *Fructobacillus pseudoficulneus*) y levadura (*Saccharomyces cerevisiae* y *Pichia kluyveri*) estuvieron presentes en ambos procesos, así como se determinó que la inoculación condujo a un chocolate con notas mas amargas o dulces que las obtenidas en el chocolate producido por fermentación espontánea. El sabor amargo fue el dominante en PH15 NI, mientras que los sabores amargo, dulce del cacao fueron dominantes en PH15 I .

Por tanto, podemos concluir que un cultivo iniciador adecuado puede dirigir correctamente el proceso de fermentación de cacao y debe estar compuesto por al menos una cepa de cada grupo de microorganismos (levadura, LAB y AAB). Sin embargo, es necesario seleccionar la cepa de LAB adecuada para evitar la sobreproducción de ácido láctico durante este proceso y por lo tanto, tener un impacto negativo sobre la calidad del grano de cacao; también el uso de cultivos iniciadores sería un problema potencial ya que la flora microbiana residente competirá con el inóculo del cultivo iniciador e incluso podría llegar a superarlo.

Claramente, comenzar con una alta densidad ayudará a la nueva población a establecerse, pero ciertamente será necesario reducir la microbiota del hospedero. Esto no será fácil sin un cambio en algunas prácticas tradicionales tanto en la cosecha y manejo de las almendras antes y durante la fermentación, para que no estén contaminadas por microorganismos que no contribuyan o generen características indeseables en el producto final (Figuroa et al. 2019; Schwan y Wheals 2004).

Proceso de formación de precursores del sabor en cacao

Los precursores esenciales del aroma se generan durante el proceso de fermentación, mediante los microorganismos del ambiente, los azúcares en la pulpa se transforman en ácido acético y láctico causando acidificación de los granos de cacao, necesaria para la formación de los precursores del sabor específico junto a la duración del proceso de fermentación y el pH final (Voigt 2013).

Desarrollo de precursores de sabor a cacao

El propósito de todas las transformaciones en las propiedades físicas y bioquímicas de las almendras de cacao, es originar algunos compuestos que servirán como precursores del sabor, los compuestos involucrados se originan en dos tipos de células: células de almacenamiento que contienen grasas, proteínas y carbohidratos y células de pigmento que contienen los compuestos fenólicos y las xantinas que mediante reacciones catalizadoras generan compuestos como: aminoácidos libres, péptidos y azúcares reductores, esta transformación de la almendra incluye un conjunto de reacciones biocatalizadas por sus enzimas endógenas: proteólisis, hidrólisis y oxidación, a partir de componentes constituyentes como proteínas, carbohidratos y

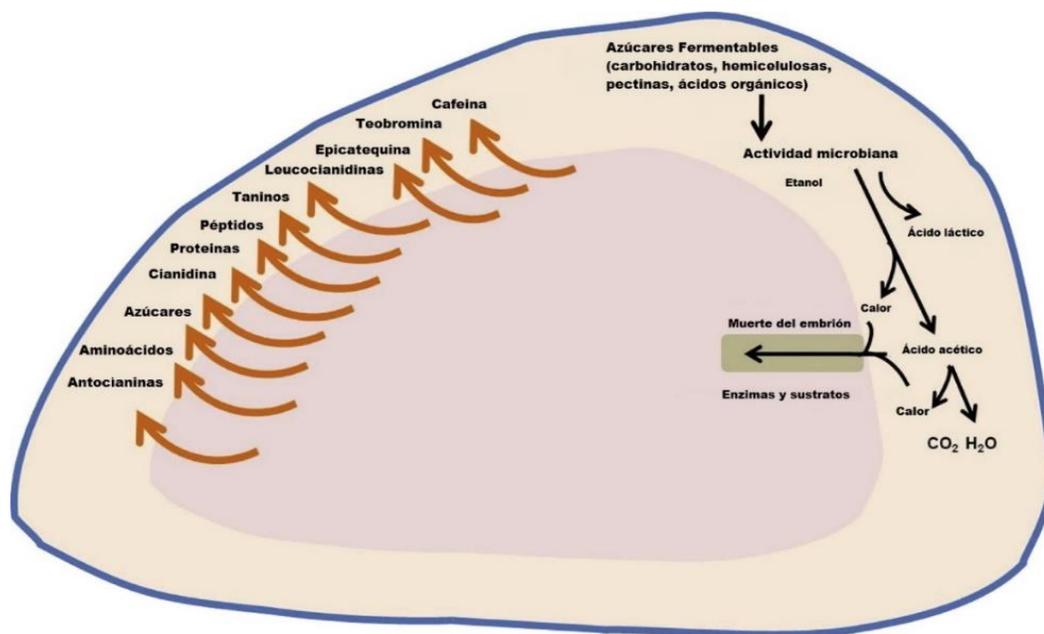
polifenoles, sustratos específicos de la actividad biocatalítica (Santander et al. 2019; Nigam y Singh 2014)

En las almendras frescas y vivas, las células y sus contenidos están separados por membranas, en el transcurso de la fermentación, se inicia la germinación, lo que provoca la absorción de agua por las vacuolas dentro de las células, después de la muerte de la almendra, por acidez y temperatura del medio, las membranas se rompen ocasionando la mezcla de enzimas y sustratos, las reacciones posteriores son los precursores del sabor. El pH, determinado principalmente por la difusión del ácido acético, es importante, y las velocidades de reacción aumentan por las temperaturas cálidas durante la fermentación y el secado (Nigam y Singh 2014; Voigt y Lieberei 2014).

Durante la fermentación, se liberan azúcares reductores y las enzimas degradan las proteínas a polipéptidos y aminoácidos, y estos azúcares originan precursores del característico sabor a chocolate (Figura 1). Una porción de los polifenoles se oxida, formando grandes moléculas de tanino. El resto de los polifenoles, la teobromina y la cafeína se difunden y exudan del grano, lo que reduce el sabor astringente y amargo (Nigam y Singh 2014).

Figura 1

Corte transversal de la almendra de cacao (*T. cacao*)



Nota. Se observa los cambios bioquímicos durante el proceso de fermentación.

Adaptada de Nigam & Singh, (2014). *Cocoa and Coffee Fermentations, Encyclopedia of Food Microbiology* (485-492).

Entre los principales compuestos responsables de generar los atributos característicos del sabor tenemos:

Las metilxantinas (cafeína y teobromina) que generan el amargor. En el transcurso de la fermentación, los niveles de metilxantinas disminuyen alrededor del 30%, probablemente dada por difusión desde los cotiledones.

Compuestos polifenólicos que generan astringencia, sus niveles caen significativamente durante la fermentación y el secado. Las antocianinas se hidrolizan rápidamente a cianidinas y azúcares (catalizadas por glucosidasas), explicando así el

blanqueamiento del color púrpura de los cotiledones. Los polifenoles oxidadas convierten los polifenoles (principalmente catequina) en quinonas. El complejo de proteínas y péptidos con polifenoles da lugar a la coloración marrón típica de los granos de cacao fermentados.

Los precursores de la reacción de Maillard se forman a partir de sacarosa y proteínas de almacenamiento. La sacarosa se convierte por invertasa en azúcares reductores. La fructosa se encuentra en los granos de cacao secos fermentados, y la glucosa se utiliza en otras reacciones. Las proteínas de almacenamiento se hidrolizan inicialmente por una endopeptidasa aspártica (pH óptimo 3.5) en oligopéptidos hidrófobos. Una carboxipeptidasa (pH óptimo 5.4-5.8) luego convierte estos oligopéptidos en oligopéptidos hidrofílicos y aminoácidos hidrofóbicos. Estos son precursores del sabor del cacao implicados en las reacciones de Maillard durante el tostado para formar compuestos de sabor del cacao (Nigam y Singh, 2014; Voigt y Lieberei, 2014).

Capítulo III

Metodología

Preparación del inóculo

Se tomaron aislamientos puros de las levaduras *Torulaspota delbrueckii* y *Hanseniaspora uvarum*, BAL *Lactobacillus plantarum* y BAA *Acetobacter ghanensis* obtenidas de la fermentación de las almendras de cacao en la empresa COFINA, estas fueron multiplicadas en distintos medios líquidos (sin agar): en el caso de levaduras se utilizó medio NYDA, para BAL se usó MRS (Man, Rogosa y Sharpe) y para BAA se preparó medio YGE (Glucose Yeast Extract), mismos que fueron esterilizados autoclavándolos a 121°C y 15 psi por 20 minutos, luego las cepas puras fueron inoculadas en los medios dentro de una cámara de flujo laminar completamente escéptica, luego se procedió a incubarlos con agitación orbital por 72 horas, obteniendo al final una concentración de 1×10^8 UFC/ml.

Ubicación geográfica del ensayo

Las muestras se colectaron en las instalaciones de producción y fermentación de COFINA/República del Cacao (Zona 1), las cuales se encuentran en la provincia de Los Ríos, cantón Vinces, parroquia Antonio Sotomayor, a una altura de 17 msnm, 1°36'00" S; 79°42'29" O (Figura 2). Esta zona presenta un clima húmedo – tropical, pluviosidad de 1000 a 2000 mm anuales, temperaturas que van de 24 a 30 °C y humedad relativa (HR) del 98 %; esta zona está clasificada como Tropical Megatérmico Húmedo, el cantón Vinces cuenta con 4 tipos de ecosistemas naturales los cuales son: el bosque semideciduo de tierras bajas, el bosque siempre verde estacional inundable aluvial del Jama-Zapotillo, el herbazal inundable ripario de tierras bajas y el herbazal inundable ripario de tierras bajas (del chocó Ecuatorial y del Jama- Zapotillo), dentro de

esta clasificación, gran parte del territorio del cantón, incluye zonas con características de intervención humana, relegando a estos ecosistemas a simples parches de vegetación original (Dutan et al. 2015).

Figura 2

Zona de experimento de campo.



Nota. Fuente (GoogleEarth, 2020)

Inoculación y muestreo de almendras durante la fermentación

En las instalaciones de COFINA/República del Cacao se fermentó las almendras o granos de cacao Nacional en sacos de yute (Figura 3), colocados sobre pallets de madera, tanto para el tratamiento inoculado con *Lactobacillus plantarum* (BAL), *Torulaspota dulbruecki*, *Hanseniaspora uvarum* (levaduras) y *Acetobacter ghanensis* (BAA), como el tratamiento no inoculado (fermentación natural); cada 24 horas se tomó la temperatura de la masa en fermentación y se extrajo muestras (Figura 4) de 150 gramos desde la hora 0 (principio del proceso de fermentación), hasta la hora 96 (final

del proceso de fermentación). Según Santander *et al.* (2019) un tiempo de fermentación corto (3-4 días), en lugar de un período de fermentación tradicional (6 días), es suficiente para obtener cacao con potencial de desarrollar un sabor de calidad. Las muestras se tomaron de distintas zonas de la biomasa de almendra en fermentación. Cada muestra se transfirió a una funda plástica, se codificó y almacenó a -20°C para su análisis químico (pH) y bioquímico.

Figura 3

Llenado de los sacos de yute con cacao nacional para su posterior fermentación



Figura 4

Toma de muestras de cacao en durante el proceso de fermentación

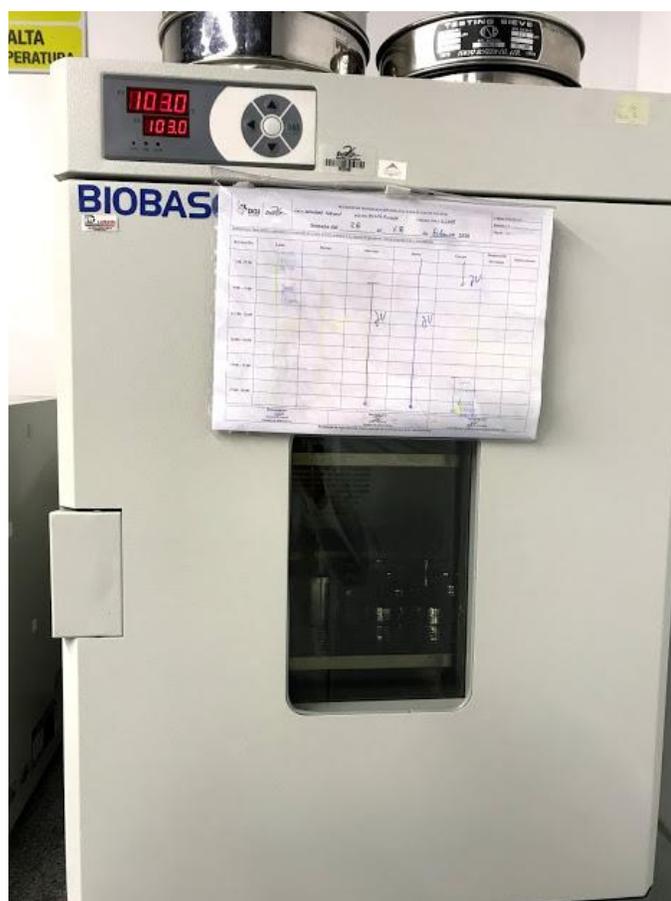
**Temperatura, pH y Contenido de Agua**

La temperatura de fermentación de la masa de cacao, se monitoreó usando un sensor digital IFC 400 (MadgeTech, Inc.). Los parámetros químicos de pH se tomaron conforme a lo descrito por Gálvez *et al.* (2007) y Senanayake *et al.* (1997), se tomaron muestras de 15 g de almendras de cacao y se añadió 135 ml de agua destilada, a esta se la agitó en vortex durante 20 segundos y se procedió a medir el pH del sobrenadante. El contenido de agua (% humedad) fue determinado en base a lo dispuesto por las normas internacionales ISO 2291-1980, donde se sometieron las almendras a un secado a 103°C durante 16 horas tanto para las muestras de las

almendras fermentadas con la adición del inóculo como las fermentadas naturalmente (Figura5).

Figura 5

Proceso de secado de las almendras de cacao para determinar su % de humedad



Características Bioquímicas

Las muestras de 150 gr de granos de cacao en baba de la variedad Nacional almacenadas a -80°C , fueron liofilizadas y posteriormente homogenizadas para analizar por cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC) (Agilent Technology 1260

Waldbronn, Alemania) los cambios en la concentración de azúcares (sacarosa, fructosa y galactosa) y ácidos orgánicos (ácidos cítrico, acético, láctico, málico y oxálico), mediante los protocolos descritos en los trabajos de Ho *et al.* (2014) y los de Nour *et al.* (2010), con algunas modificaciones.

Concentración de azúcares

Para medir el contenido de azúcares se realizó extractos preparados a partir de 500 mg de cada muestra, los cuales se disolvieron en 50 mililitros de agua MilliQ y posteriormente agitados en la máquina de ultrasonido (ULTRASONIC BATH 5,7L, Fisher Scientific) durante 20 minutos, luego se prosiguió a tomar 100 mililitros (pH 13.5 con 0.3 M NaOH) de la solución y mezclarla con 100 µl de metanol en solución 0.5 M. Estas muestras fueron incubadas a baño maría durante dos horas a una temperatura de 70°C, para posteriormente ajustar su pH usando HCl 0.3 M. El producto resultante de esto se evaporó y sus residuos fueron mezclados con cloroformo y agitados vigorosamente, posterior a esto fueron retiradas las láminas de sus respectivos residuos acuosos, se eluyeron por medio del equipo HPLC (Eclipse Plus C18 250 x 4.6 mm, 5 µm), usando una fase móvil de buffer fosfato 0.1 M más acetonitrilo en con una relación de concentración 83:17 (% volumen : volumen) con una caudal de 1 mililitro/minuto con 20 µl de inyección a una temperatura de 35°C y se midió mediante el equipo UV/VIS, el cual detecta longitudes de onda de 245 nm.

Concentración de ácidos orgánicos

Se prepararon extractos utilizando 5 g de cada una de las muestras de cacao liofilizado, se los disolvió en 60 mililitros de agua MilliQ y se agitaron durante 10 min, posteriormente estos extractos fueron centrifugados a 5000 rpm durante 30 min a una temperatura de 5°C, el sedimento que se generó fue lavado dos veces con 20 mililitros

de agua MilliQ, para luego centrifugar los sobrenadantes durante 15 min y ser filtrados mediante usando Millex Millipore 0.45 μm (membrana). Estos extractos se removieron mediante el equipo de HPLC usando 50 mM KH_2PO_4 (Fosfato monopotásico) ($\text{pH}=2.8$ con ácido fosfórico) como fase móvil y un caudal de 0.7 ml/min, inyectando 10 μL de la solución a 20°C y posteriormente detectado por el equipo 1260 Infinity II Multiple Wavelength Detector (Detector de diodo array Agilent) a una longitud de onda de 210 nm. Una vez obtenidos las lecturas, la concentración de los ácidos fue determinada por comparación con curvas estándares de las soluciones madre comerciales de cada ácido analizado.

Análisis de datos

Los datos se recolectaron y analizaron por el software del equipo de HPLC. La concentración de ácidos orgánicos y azúcares fueron determinados comparando con curvas estándares construidas a partir de soluciones estándar, los datos fueron expresados en miligramos por gramo de materia seca de cacao (mg/g ms).

Contenido total de polifenoles (TPC o CTP)

Fue determinado mediante espectrofotometría de masas, usando el protocolo descrito por Carrillo *et al.* (2014), con algunas modificaciones, para esto se el extracto metanolico de 100 μL (a partir de 2 gr de la muestra inicial de cacao disueltos en 40 ml de metanol) se mezcló con 50 μL del reactivo Folin-Ciocalteu`s, 750 μL de agua destilada y 100 μL de una solución de Na_2CO_3 . Estas muestras fueron almacenadas en un medio obscuro a temperatura ambiente durante una hora, transcurrido el tiempo se procedió a medir la absorbancia usando el espectrofotómetro (Shimadzu/UVmini) a una longitud de onda de 760 nm, las lecturas obtenidas se basaron en una curva de

calibración referencial de ácido gálico generando al final resultados expresados en mg de equivalentes de ácido gálico/gramo de materia seca (mg EAG/g ms).

Análisis de microorganismos

Cuantificación de la dinámica poblacional

Se determinó al mezclando en bolsas de plástico estéril (Ziploc) 15g de las almendras con 135ml de agua destilada, para posteriormente agitar y homogenizar en el equipo de Vortex durante 30 segundos a alta velocidad. Se realizó diluciones en serie de 10 de cada una de las muestras, siendo las diluciones 3 y 4 las que se inoculó y esparció en las placas Petri por triplicado con diferente medio, según el microorganismo, MEA Y Rosa de Bengala para hongos filamentosos y levaduras; MRS plus para bacterias ácido lácticas; GYEA para bacterias ácido acéticas y Agar NYDA para microorganismos mesófilos, posteriormente las placa petri fueron incubados durante 1 a 4 días a 28°C, siendo las levaduras, hongos filamentosos, bacterias ácido acéticas y microorganismos mesófilos incubados aeróbicamente, mientras que las bacterias ácido lácticas anaeróbicamente, transcurrido el tiempo de inoculación se contaron el número de colonias presentes en cada placa.

Prueba de corte

Para esto se extrajo 100 almendras de cacao de diferentes zonas del saco tanto del tratamiento inoculado como de la fermentación natural, estas se las procedió a cortar por la mitad y se evaluó rápidamente para evitar procesos oxidativos, ahí se tomó en cuenta a todos los granos bien fermentados los cuales tenían surcos internos bien definidos, que tenían color café (claro u oscuro), que son características de estos, sin considerar granos parcialmente fermentados, pizarrosos, con manchas blancas, mohosos, sobrefermentados o sin fermentar (INEN 2018; Coexca 2017).

Diseño Experimental

Se evaluaron dos factores: (i) tipo de inoculación (inoculado con *Torulaspota delbrueckii*, *Hanseniaspora uvarum*; bacteria ácido láctica: *Lactobacillus plantarum*; bacteria ácido acética: *Acetobacter ghanensis* y No inoculado o Fermentación natural) y (ii) tiempo u hora de fermentación (0, 24, 48, 72, 96 horas). Cada saco de yute en el cual se encontraban aproximadamente 60kg de almendras de cacao fue una unidad experimental, usando en total 4 sacos. El experimento se realizó bajo un diseño completamente al azar, en parcela dividida (2x5) con 2 repeticiones, representándose de la siguiente manera su modelo matemático:

$$Y_{ijk} = \mu + P_i + S_{k(i)} + T_j + (PT)_{ij} + e_{ijk}$$

Donde:

Y_{ijk} = Variable aleatoria.

μ = Media general.

P_i = Efecto del i-ésimo tipo de fermentación (natural o inoculada).

$S_{k(i)}$ = Error para el tipo de fermentación.

T_j = Efecto de la j-ésima hora de fermentación.

$(PT)_{ij}$ = Efecto de la interacción Tipo de fermentación x Hora de fermentación.

e_{ijk} = Error para la hora de fermentación

La disposición del experimento en el campo se muestra en la Figura 6.

Figura 6

Croquis experimental

CROQUIS EXPERIMENTAL				
T I E M P O (h o r a s)	INOCULADO	NO INOCULADO	NO INOCULADO	INOCULADO
	0	0	0	U
	24	24	24	24
	48	48	48	48
	72	72	72	72
	96	96	96	96

Análisis Estadístico

La temperatura, pH, dinámica poblacional, contenido de azúcares, ácidos orgánicos y polifenoles totales fueron caracterizados por estadística descriptiva (media \pm desviación estándar). Las variables entre tratamientos fueron comparados realizando un Análisis de Varianza y una prueba LSD Fisher al 5%, analizando el efecto de los tratamientos o efectos de cada uno de sus componentes (hora o inoculación), además se realizó un análisis de correlación de Pearson con el fin de determinar el grado de asociación entre las distintas variables analizadas. Todos los análisis se hicieron mediante el software de INFOSTAT (Di Rienzo et al. 2018).

Capítulo IV

Resultados y Discusión

Temperatura, pH y contenido de humedad

Al analizar la temperatura de la masa de fermentación no se observaron diferencias significativas entre los tratamientos, pero hubo efecto del factor tiempo de fermentación (Tabla 1), presentando temperaturas mayores al final del proceso de fermentación; esto se debe a la acción de bacterias ácido acéticas y levaduras las cuales producen reacciones exotérmicas, haciendo de esta manera que aumente la temperatura de la masa de fermentación (Fleitas 1998). Los valores de temperatura en este estudio fueron de 26,03 a 44,93°C que concuerdan con los valores obtenidos por El Salous *et al.* (2019) quienes presentaron temperaturas de masa entre 28-45 °C y de Cempaka *et al.* (2014) con valores entre los 30-45°C.

En cuanto al pH de la pulpa, no se encontraron diferencias significativa entre los tratamientos, pero si se encontró un efecto del factor tiempo ($p < 0,0001$) en el proceso de fermentación (Tabla 1) siendo las primeras horas de fermentación (0-48) las que presentaron los valores más bajos (3,63-4,28), incrementando a un máximo de 4,88 a las 72 horas, disminuyendo de nuevo a las 96 horas a 4,70. Este comportamiento se debe a que al inicio del proceso fermentativo las levaduras comienzan a descomponer el ácido cítrico de la pulpa, lo que conlleva a un aumento en el pH (Fleitas 1998). Otros investigadores también muestran resultados similares, así Ardhana y Fleet (2003) encontraron que el pH de la pulpa de cacao incrementaba desde el inicio de la fermentación (3,7 y 3,9) a valores entre 4,8 y 4,9 al final del proceso fermentativo.

En cuanto al porcentaje de humedad (%H) de las almendras no se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos, pero si para el factor tiempo ($p = 0,0057$),

presentado el mayor porcentaje de humedad a las 0 horas (62,79%) y terminando el proceso de fermentación con 59,33 % (Tabla1). Este comportamiento es normal ya que por el proceso de fermentación se libera calor por reacciones exotérmicas, generando pérdida de humedad de la almendra en forma de vapor de agua, hecho que concuerda con Alamilla *et al.* (2007), quienes mencionan que al final de la etapa de fermentación las almendras de cacao tiene entre un 55 a 60 % de humedad.

Tabla 1

Promedio \pm desviación estándar de pH y temperatura en almendras de cacao durante la fermentación

Variables	Tiempo de fermentación (h)				
	0	24	48	72	96
pH	3,63 \pm 0,13 ^a	3,98 \pm 0,17 ^b	4,28 \pm 0,05 ^c	4,88 \pm 0,13 ^d	4,70 \pm 0,14 ^d
Temperatura	26,03 \pm 1,75 ^a	31,63 \pm 1,38 ^b	36,70 \pm 1,09 ^c	42,05 \pm 1,32 ^d	44,93 \pm 1,20 ^e
% H	62,79 \pm 0,81 ^a	58,64 \pm 1,31 ^{bc}	59,34 \pm 1,70 ^b	56,86 \pm 1,97 ^c	59,33 \pm 2,27 ^b

Nota: Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$).

Contenido de azúcares

El contenido de sacarosa no presentó diferencias significativas entre los tratamientos pero si se observó un efecto del factor tiempo ($p=0,0001$). Durante las primeras horas se presentó un contenido mayor de sacarosa disminuyendo un 53 % a las 96 horas (Tabla 3). Esto ocurre por la acción de la enzima invertasa que participa en la hidrólisis de la sacarosa en glucosa y fructosa por acción principalmente de levaduras en las primeras etapas del proceso fermentativo. Se pudo observar que en el

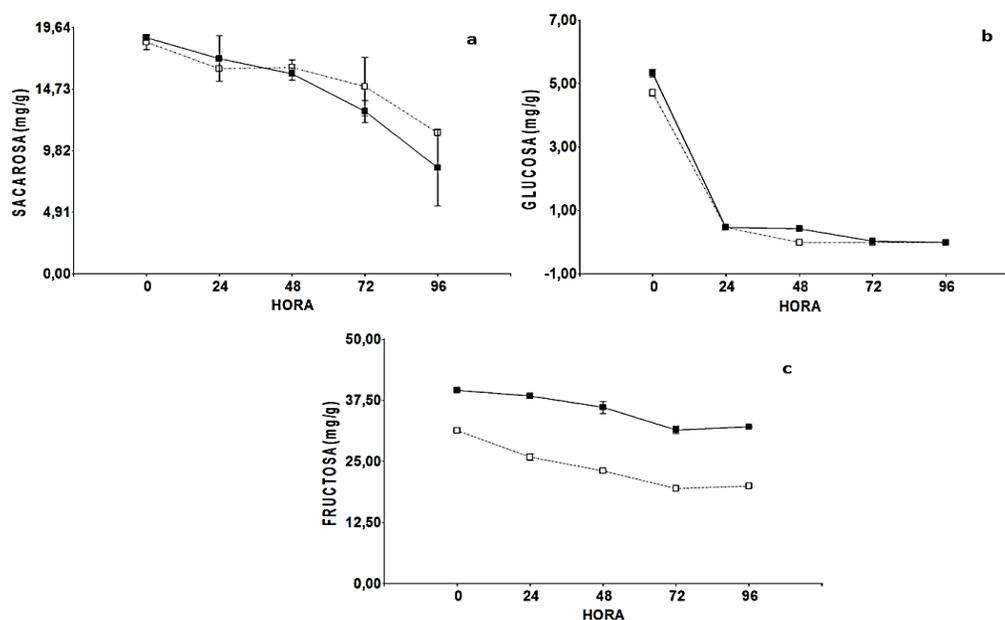
tratamiento inoculado, a partir de las 24 horas se tuvo un decrecimiento constante hasta las 96 horas, debido al metabolismo de las levaduras que se adicionaron en el inóculo iniciador. *T. delbrueckii* y mayoritariamente de *H. uvarum* aunque tienen predilección por el consumo de glucosa también pueden oxidar este azúcar, especialmente la especie *H. uvarum* que según Ooi *et al.* (2020), es una especie con gran potencial por su producción de enzima invertasa durante la fermentación, produciendo en mayor cantidad sólidos solubles totales en las almendras de cacao (Lacerda *et al.* 2014; Kurtzman 2011; UCDavis 2010).

En cuanto al contenido de azúcares (Figura 7), se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos para el contenido de glucosa y fructosa (Tabla 2). La glucosa ($p < 0,0001$) se consumió por completo en la fermentación natural a las 48 horas mientras que para el tratamiento inoculado esto sucedió después de las 72 horas. Esto se debe a que esta azúcar es la más usada en el proceso fermentativo por las levaduras para convertirla en etanol y CO₂ y por las BAL que a través de la vía Embden-Meyerhof producen más del 85% de ácido láctico (Schwan y Wheals 2004). En la concentración de fructosa ($p = 0,0021$) se observó una disminución desde las 0 a las 72 h. Según Viesser *et al.* (2020), esto puede suceder por la presencia de BAL fructofílicas como *L. plantarum*, que prefieren a la fructosa más que a la glucosa. Posteriormente, se observó un aumento para las 96 horas de fermentación en el tratamiento con adición de inóculo (32,14 mg/g ms) comparado con la fermentación natural (20 mg/g ms) esto pudo ser debido a la acción de las levaduras que se mantienen durante todo el proceso fermentativo y que al no tener un sustrato como la glucosa comienzan a hidrolizar sacarosa, de ahí que siguen con un consumo de glucosa y el contenido de fructosa va aumentando. Estas diferencias tan grandes

también se dan porque al inicio del proceso fermentativo este azúcar se encontraba en altas concentraciones en el tratamiento inoculado (39,62 mg/g ms) comparado con el natural (31,29), al igual que la glucosa es utilizada por los microorganismos para generar etanol, ácidos, CO₂ y son considerados como precursores del sabor involucrados en reacciones de pardeamiento no enzimáticas de Maillard (Santander et al. 2019).

Figura 7

Contenido de azúcares en las almendras de cacao durante el proceso fermentativo



Nota: Contenido de sacarosa (a), glucosa (b), fructosa(c), tratamientos representados con cuadrados negros ■ y fermentación natural con cuadrados blancos □ .

Dinámica poblacional de microorganismos

Existieron diferencias significativas entre los tratamientos (Figura 8) para levaduras, bacterias ácido lácticas (BAL), bacterias ácido acéticas (BAA), y hongos

filamentosos. En el caso de levaduras ($p=0,0243$) podemos observar que al inicio tanto para la fermentación natural como para el tratamiento inoculado, la cantidad de levaduras fue similar ($3,16 \times 10^7$ UFC/g y $5,75 \times 10^7$ UFC/g), esto difiere con lo encontrado por Fleitas (1998) quien al inicio de la fermentación obtuvo 1×10^6 UFC/g. En este estudio, se observó una mayor cantidad de levaduras al final de la fermentación con la adición del inóculo ($6,46 \times 10^5$ UFC/g) comparado con la natural ($7,76 \times 10^4$ UFC/g), esto se debe quizá a que entre los microorganismos del inóculo se encontraba las levaduras *H. uvarum* y *T. delbrueckii*, hecho que concuerda con Fleitas (1998) quien al inocular una levadura (1×10^{10} UFC/g), 2 BAL (1×10^7 UFC/g), 2 BAA (1×10^8 UFC/g), obtuvo una concentración de levaduras de 1×10^5 UFC/g a las 96 horas, del mismo modo Cempaka *et al.* (2014) observaron que la población de levaduras en la fermentación natural disminuyó a $2,8 \times 10^4$ UFC/g después de 96 horas.

Las BAL (bacterias ácido lácticas) ($p=0,0100$) presentaron a las 96 horas una mayor población en la fermentación natural ($2,63 \times 10^7$ UFC/g) comparado con la población inoculada ($4,9 \times 10^6$ UFC/g) (Figura 5), esto quizá se debe a que el contenido de ácido cítrico en este periodo fue mayor en la fermentación natural (26,78 g/100g muestra seca). Según Santander *et al.* (2019), las BAL se alimentan de ácido cítrico y los carbohidratos residuales de la pulpa, para convertirlos en ácido láctico, ácido acético y / o manitol. En este estudio se encontró que la mayor población de BAL se obtuvo a las 0 horas (Figura 5) tanto para la fermentación natural como para el tratamiento con población inoculada ($4,5 \times 10^7$ UFC/g y $7,94 \times 10^7$ UFC/g respectivamente) lo que difiere por lo encontrado por Gálvez *et al.* (2007) quien encontró que a las 48 horas era mayor la población de BAL con $7,3 \times 10^7$ UFC/g.

En cuanto a las bacterias ácido acéticas ($p=0,0008$) en la fermentación natural hay una caída muy drástica desde las 0 hasta las 96 horas ($3,89 \times 10^7$ UFC/g a $3,16 \times 10^4$ UFC/g) mientras que para el tratamiento inoculado no fue tan drástica esta disminución ($7,08 \times 10^7$ UFC/g a $1,55 \times 10^6$ UFC/g) esto se debe a que se inoculó con una BAA y también al contenido de ácido láctico presente durante el proceso el cual fue mayor durante las primeras 48 horas, este constituye el sustrato del cual se van a alimentar y a utilizar al igual que el etanol para producir ácido acético (Ho et al. 2018; De Vuyst y Leroy 2020).

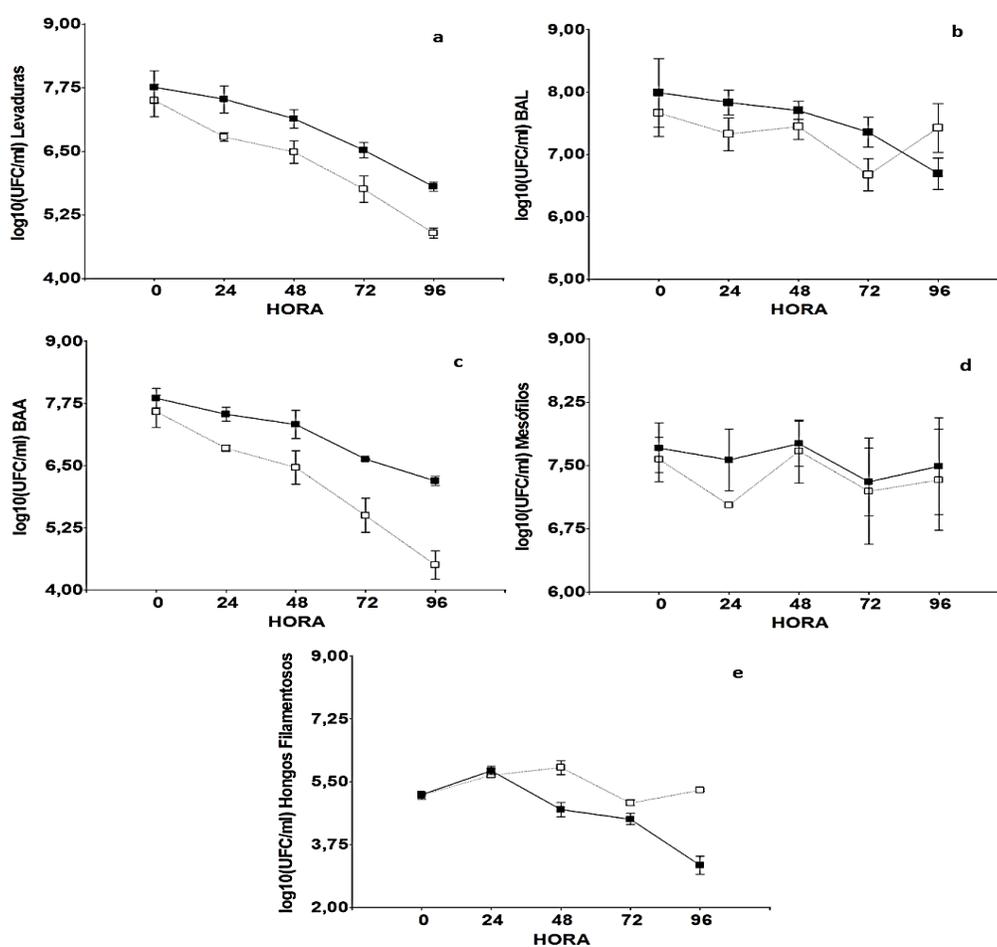
En el caso de los hongos filamentosos se encontró una reducción de 2,1 niveles logarítmicos en el tratamiento inoculado con el cultivo iniciador comparado con la fermentación natural ($1,86 \times 10^5$ y $1,48 \times 10^3$ UFC/g UFC/g, respectivamente), esto puede deberse al inóculo con BAL y levaduras. Según Romanensa et al. (2019), especies como *Lactobacillus* sp., y *Hanseniaspora* sp., presentan mayor inhibición en el crecimiento de hongos filamentosos producto de sus metabolitos como ácido acético, láctico entre otros, dándonos así un producto con mejor calidad. Producto del metabolismo de hongos filamentosos se generan toxinas que disminuyen la calidad del cacao y con una posible toxicidad al consumidor final (Ramos et al. 2016).

Se encontró también que la población de bacterias mesófilas no presento diferencias significativas entre los tratamientos ($p>0,05$), pero si se encontró un efecto para el factor tiempo sobre estas poblaciones ($p=0,039$), encontrándose en mayor cantidad a las 48 horas (Tabla 5) del proceso fermentativo ($5,13 \times 10^7$ UFC/g), sin embargo su dinámica poblacional no tuvo mucha variación durante todo el proceso. Hasta el momento no se sabe muy bien cuál es el rol específico que cumplen estos microorganismos, según Schwan y Wheals, (2004) estos organismos producen

compuestos químicos como el 2,3-butanodiol, pirazinas, ácido acético y láctico, que pueden contribuir al incremento de la acidez o a la producción de sabores poco agradables en las almendras de cacao fermentadas.

Figura 8

Dinámica poblacional de microorganismos en el proceso de fermentación



Nota: Dinámica poblacional representado en \log_{10} (UFC/ml) de: levaduras(a), BAL(b), BAA(c), microorganismos mesófilos (d) y hongos filamentosos(e), tratamientos representados con cuadrados negros ■ y fermentación natural con cuadrados blancos □

Contenido de ácidos orgánicos

En el caso de los ácidos orgánicos (Figura 9), tanto el ácido cítrico, oxálico y málico presentaron diferencias significativas entre los tratamientos (Tabla 6). El ácido cítrico mostró diferencias significativas ($p=0,006$) entre la fermentación natural (26,78mg/g ms) comparado con el tratamiento inoculado con el coctel microbiano (12,56mg/g ms) al final del proceso fermentativo (96 horas). Esta respuesta se debe principalmente a que hay una mayor cantidad de microorganismos degradadores (levaduras y BAL) de este ácido en el tratamiento inoculado (Fonseca et al. 2020), otro razón de esta disminución en el tratamiento inoculado podría deberse a que en este consorcio se encontraba *Lb. Plantarum* el que según Ouattaraa et al. (2017) es un microorganismo productor de citrato liasa que le permite consumir de manera más eficiente y rápida el ácido cítrico en las primeras etapas de la fermentación.

En cuanto, el contenido de ácido málico ($p=0,0001$) para la fermentación natural se observó un aumento desde las 0 hasta las 72 horas (1,33 - 3,5 mg/g ms) pero de allí disminuyó (2,58 mg/g ms), hecho que concuerda con Dircks (2009), quien en procesos fermentativos naturales encontró un crecimiento de ácido málico durante las primeras 72 horas y posteriormente decreció; mientras que para el tratamiento inoculado el ácido málico comenzó con una concentración de 1 mg/g ms y finalizó con 4,56 mg/g ms. Este aumento en el contenido de ácido málico podría estar dado por una mayor presencia de levaduras en el tratamiento, ya que según Dircks (2009) las levaduras son capaces de producir en bajas cantidades ácido oxálico, succínico, acético, fosfórico y málico. El ácido oxálico ($p=0,0086$) en la fermentación natural al igual que con el ácido málico aumentó durante las primeras 72 horas (5,38 - 14,02 mg/g ms) y de ahí disminuyó (8,62 mg/g ms), mientras que para el tratamiento inoculado el ácido oxálico tuvo picos y

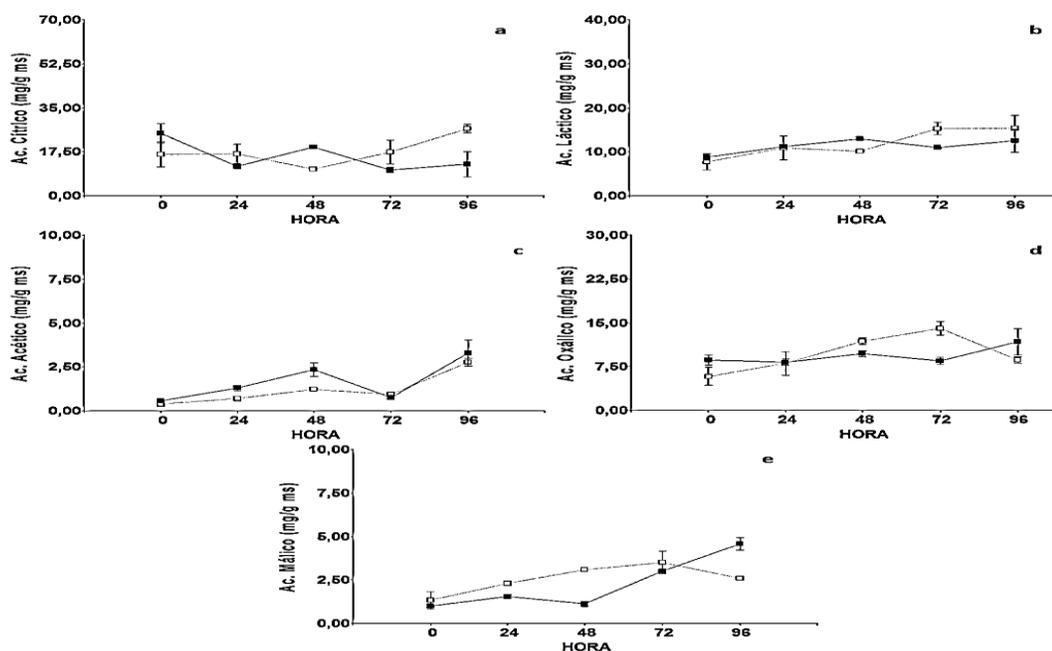
caídas en su concentración durante toda la fermentación con una concentración a las 0 horas de 8,64 mg/g ms y a las 96 horas de 11,72 mg/g ms. Estos hallazgos tanto en la fermentación natural como la fermentación del tratamiento con el coctel inoculado son superiores a los reportados por Dircks (2009), quien obtuvo concentraciones entre 1,25 a 10 mg/g ms de este ácido, así como a los reportados por Muñoz y Gómez (2020), quienes obtuvieron 4,55 a 3,80 mg/g ms (0-96 horas) en cacao variedad Nacional. A pesar de que ácidos como el málico y oxálico son considerados como los menos importantes durante el proceso fermentativo junto a los ácidos fosfórico, succínico y acético, estos permeabilizan y matan los cotiledones del frijol. Además según Puerari et al. (2012), estos ácidos que son producidos por levaduras y algunas bacterianas contribuirían al sabor, dándole tonos más refrescantes, mejorando el aroma, sumado a que tiene propiedades antimicrobianas para el control del deterioro de la calidad de los alimentos causado por microorganismos (López et al. 2019 y Fleitas 1998).

No se encontraron diferencias significativas en las concentraciones de ácido láctico y ácido acético entre los tratamientos, pero se observaron efectos del factor tiempo ($p=0,0163$ y $p<0,0001$, respectivamente). En el caso del ácido láctico se observó que a las 72 y 96 horas (Tabla 7) se tienen las concentraciones más altas (13,14 y 13,94 mg/g ms), esto debido a la transformación del ácido málico a ácido láctico y CO₂ por parte de algunas BAL como *Lb. plantarum* (Mayo y Flórez 2016). Estos son superiores a los observados por Dircks (2009), quien reporta valores finales entre 6 a 10 mg/g ms, pero se acercan a los valores reportados por Muñoz y Gómez (2020), quienes obtuvieron 14,46 mg/g ms de ácido láctico al cuarto día de fermentación. Estas variaciones pueden deberse a la poca dinámica poblacional que presentaron las BAL (Tabla 4) durante el proceso de fermentación, ya que estas se encargan de convertir el

ácido cítrico y los carbohidratos residuales de la pulpa, principalmente en ácido láctico, ácido acético y / o manitol (Santander et al. 2019). Para el ácido acético se encontró un mayor contenido a las 96 horas (3,03 mg/g ms), esto se debe a la acción de microorganismos como las BAA que oxidan tanto el ácido láctico como el etanol producidos por las BAL y levaduras respectivamente para producir este ácido, hecho tan fundamental para la muerte del embrión y generar un cacao con elevado nivel de acidez. A pesar de que entre los tratamientos no hubo diferencias significativas el contenido de ácido acético influye en las poblaciones de hongos filamentosos haciendo que estas disminuyan (Santander et al. 2019).

Figura 9

Contenido de ácidos en las almendras de cacao durante el proceso fermentativo



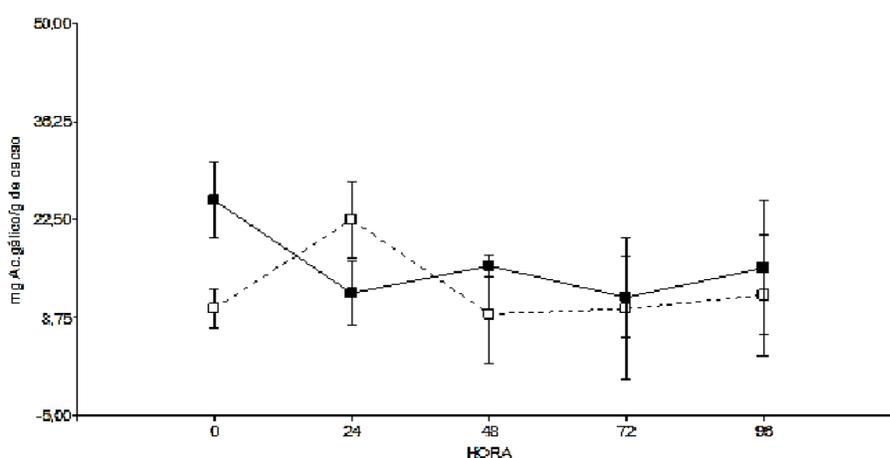
Nota: Contenido total de ácidos orgánicos representados en mg/g de materia seca (ms): cítrico (a), láctico (b), acético (c), oxálico (d) y málico (e), tratamientos representados con cuadrados negros ■ y fermentación natural con cuadrados blancos □.

Contenido de polifenoles totales

En cuanto al contenido de polifenoles totales (mg ácido gálico/g ms) no hubo diferencias significativas entre tratamientos ni para factores ($p>0,05$), pero se pudo observar que a las 0 y 24 horas se obtuvo los contenidos más altos de polifenoles (17,64 y 17,38 mg ácido gálico/g ms), bajando a las 48 y 72 horas (12,62 y 10,81mg ácido gálico/g ms) y aumentando de nuevo a las 96 horas (13,82 mg ácido gálico/g ms). Nuestros valores son muy inferiores a los reportados por Muñoz y Gómez, (2020), quienes reportaron que para cacao Nacional hubo 44,29 mg/g en el primer día de la fermentación disminuyendo a 36,78mg/g en el último día. Este contenido inferior puede deberse a diversos aspectos como: la época de cosecha, la edad de la planta, sin embargo contenidos bajos de polifenoles generan chocolates con menor astringencia y amargor.

Figura 10

Contenido de polifenoles totales durante la fermentación de almendras de cacao



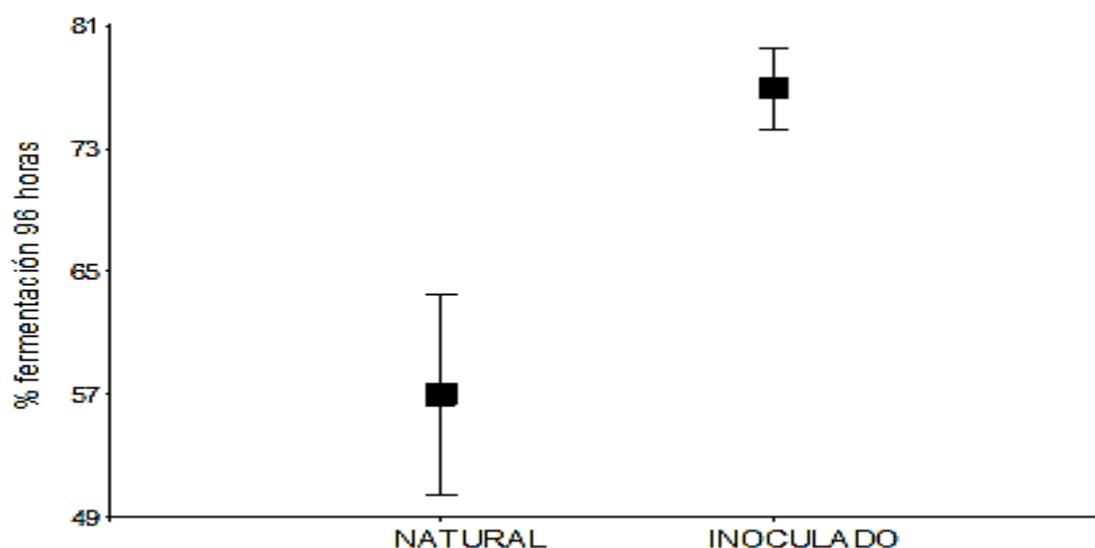
Nota: Los tratamientos están representados con cuadrados negros ■ y la fermentación natural con cuadrados blancos □.

Prueba de corte

Se observó que a las 96 horas de fermentación el porcentaje de almendras bien fermentadas en el tratamiento natural fue del 57,33%, mientras que para el tratamiento inoculado fue del 77%, este valor está dentro del rango establecido en las normas NTE INEN 176 (Quinta revisión) para el cacao nacional (Arriba Superior Selecto), el cual señala el 75% como mínimo (INEN 2018). Estos valores concuerda con lo observado por El Salous *et al.* (2019), quienes al inocular con 0.5 gramos de levadura (*Saccharomyces cerevisiae*) y 0.24 gramos de bacteria (*Acetobacter aceti*) por cada 100 gramos de cacao obtuvieron un 72% de almendras de cacao fermentadas y se acerca a lo observado por Fonseca *et al.* (2020) quienes inoculando dos levaduras, una BAL y una LAB obtuvieron a las 120 horas 81,82 % de fermentación con un pH de 4,71.

Figura 11

Porcentaje de fermentación de las almendras de cacao a las 96 horas de fermentación



Análisis de correlación

Se analizaron los coeficientes que fueron superiores a 0,5 y a la vez tuvieron niveles de significancia ($p < 0,05$).

Para la fermentación natural (Tabla 8) se encontró una correlación positiva entre los distintos azúcares con la población de levaduras ya que estas se desarrollan mejor cuando hay más sustrato del cual se puedan alimentar, también se encontró que se correlacionaban negativamente con el pH y todos los ácidos orgánicos al igual que las levaduras y BAL ($p < 0,05$) ya que durante el proceso estos microorganismos degradan los azúcares convirtiéndolos en ácidos y otros compuestos aromáticos, mientras que los microorganismos (BLA, BAA, levaduras) se correlacionaron negativamente con la mayoría de ácidos, esto debido a procesos enzimáticos donde estos se consumen y transforman, generando en algunos casos aumento de temperatura, aumento o disminución de pH (Santander et al. 2019).

Mientras que para el tratamiento inoculado (Tabla 9) se presentaron las mismas correlaciones con diferencia que en este caso los hongos se correlacionaron negativamente con diversos ácidos (acético, oxálico y málico) al igual que con el pH y temperatura, lo cual indica que este tipo de ácidos principalmente el acético que inhibe el crecimiento de los hongos filamentosos durante el proceso fermentativo (Romanensa et al. 2019).

Capítulo V

Conclusiones y Recomendaciones

Conclusiones

La fermentación del cacao es un proceso en el cual intervienen muchos factores para llegar a los estándares deseados, entre estos: la temperatura ambiental, temperatura de la masa en fermentación, pH, contenido de humedad, contenido de azúcares, ácidos, polifenoles, alcoholes, diversidad microbiana.

Al adicionar un cultivo iniciador a base de un consorcio microbiano compuesto por dos levaduras (*Torulaspota delbrueckii* y *Hanseniaspora uvarum*); una BAL (*Lactobacillus plantarum*) y una BAA (*Acetobacter ghanensis*) al principio del proceso de fermentación de cacao se observó que por efecto de las levaduras adicionadas ocurrió una mayor hidrólisis de la sacarosa (por enzimas invertasas) a glucosa y fructosa dando así un retraso de 24 horas en el consumo total de glucosa en comparación a la fermentación natural. De la misma manera la fructosa tuvo valores altos durante todo el proceso fermentativo debido a esta hidrólisis, esto generó a su vez cambios en el contenido de ácidos en el tratamiento inoculado, observándose al final del proceso (96 horas) un 53,1% y 18,38 % menos contenido de ácido cítrico y láctico respectivamente y un aumento del 76,74%, 35,96% y 19,13% en los contenidos de ácido málico, oxálico y acético comparado con la fermentación natural. Aunque no se observaron diferencias significativas en el contenido de polifenoles totales, el tratamiento si obtuvo al final 32,46% más contenido de polifenoles que el control.

La adición del inóculo inicial más los cambios en el contenido tanto de azúcares como de ácido generaron cambios de temperatura y pH en la masa, esto dio como resultado que la dinámica de microorganismos se vea afectada observándose durante

todo el proceso que las poblaciones de levaduras, BAA y microorganismos mesófilos se mantengan superiores a las del control, a excepción de las BAL que disminuyeron a partir de las 72 horas y los hongos filamentosos que a partir de las 24 horas su población comenzó a disminuir en el tratamiento inoculado, llegando a disminuir su población a las 96 horas un 79%, comparado con la fermentación natural, esto debido a la producción de ácidos (acético) o metabolitos de las levaduras y BAL.

Se encontró que la adición del inóculo aumentó el porcentaje de fermentación en 24,49% en comparación a la fermentación natural, permitiendo que las almendras de cacao variedad Nacional esté apto para la etapa de secado a las 96 horas, lo cual permite mantener azúcares reductores y ácidos que posiblemente mejoran las características organolépticas del producto final.

Recomendaciones

En procesos de fermentación con adición de inóculos a parte de los parámetros en este estudio, se debe analizar en futuras investigaciones el contenido de etanol ya que está relacionado directamente en algunos procesos y reacciones durante el proceso fermentativo; contenido de los distintos tipos de polifenoles como el epicatequina, catequina, galocatequina ya que estos son esencial para el desarrollo del sabor y el color del frijol; contenido de lípidos durante el proceso de fermentación y secado, también sería ideal realizar pruebas de cata por personas especializadas que reporten cuales son las cualidades que se han mejorado o se han perdido tanto en sabor como en aroma.

Realizar un análisis completo a nivel nacional del contenido de azúcares, ácidos orgánicos, alcoholes, lípidos, polifenoles, microorganismos involucrados, etc., durante el

proceso de fermentación y secado del cacao Nacional, para de esta manera crear y analizar nuevos consorcios que nos permitan disminuir el tiempo de fermentación y contaminación de hongos, aumentar las características organolépticas o generar productos con sabores y aromas específicos para mercados determinados.

Promover la producción e investigación del cacao variedad Nacional ya que hay poca información de esta variedad a pesar de ser una de las más apreciadas internacionalmente por su sabor y aroma.

Bibliografía

- AGROCALIDAD. (2013). *Manual de aplicabilidad de buenas prácticas agrícolas para Cacao*. Ministerio de Agricultura y Ganadería. <http://www.agrocalidad.gob.ec/wp-content/uploads/pdf/inocuidad/manuales-aplicabilidad/manual-aplicabilidad-cacao-nuevo.pdf>
- Alamilla, G., Salgado, M., Barel, M., Berthomieu, G., Rodríguez, G. y García, M. (2007). Moisture, acidity and temperature evolution during cacao drying. *Journal of Food Engineering*, 79(4), 1159-1165.
doi:<https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2006.04.005>
- Anecacao. (2019). *Boletín mensual de anecacao, estadísticas de exportación*.
<http://www.anecacao.com/index.php/es/estadisticas/estadisticas-actuales.html>
- Ardhana, M. y Fleet, G. (2003). The microbial ecology of cocoa bean fermentations in Indonesia. *International Journal of Food Microbiology*, 86(1), 87-99.
[https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(03\)00081-3](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(03)00081-3)
- Bhattacharjee, R. y Akoroda, M. (2018). Taxonomy and classification of cacao. *Achieving sustainable cultivation of cocoa* (pp. 3–18). Burleigh Dodds Science Publishing. <https://doi.org/10.19103/as.2017.0021.01>
- Carrillo, L., Londoño, J. y Gil, A. (2014). Comparison of polyphenol, methylxanthines and antioxidant activity in Theobroma cacao beans from different cocoa-growing areas in Colombia. *Food Research International*, 60, 273-280.
<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0963996913003463>

- Cempaka, L., Aliwarga, L. y Purwo, S. (2014). Dynamics of Cocoa Bean Pulp Degradation during Cocoa Bean Fermentation: Effects of Yeast Starter Culture Addition. *Journal of mathematical and fundamental sciences*, 46(1), 14-25.
<https://doi.org/10.5614/j.math.fund.sci.2014.46.1.2>
- CFN. (2018). *FICHA SECTORIAL: Cacao y Chocolate*. Cooperación Financiera Nacional. <https://www.cfn.fin.ec/wp-content/uploads/2018/04/Ficha-Sectorial-Cacao.pdf>
- Coexca. (2017). *Instructivo control calidad / Coexca* . Obtenido de https://www.swisscontact.org/_Resources/Persistent/d/3/b/f/d3bfbb5a8d042f05cbf5533494e288f2c52800b8/Guia_de_buenas_practicas_de_poscosecha.pdf
- Copetti, M., Iamanaka, B., Pitt, J. y Taniwaki, M. (2014). Fungi and mycotoxins in cocoa: From farm to chocolate. *International Journal of Food Microbiology*(178), 13-20.
<https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2014.02.023>
- Dand, R. (2011). *The international cocoa trade..* Woodhead Publishing Limited.
<https://doi.org/10.1016/C2013-0-16163-6>
- de Melo, G., Soccol, V. y Soccol, C. (Noviembre de 2016). Current state of research on cocoa and coffee fermentations. *Current opinion in food science*, 7, 50-57.
<https://doi.org/10.1016/j.cofs.2015.11.001>
- De Vuyst, L. y Leroy, F. (2020). Functional role of yeasts, lactic acid bacteria, and acetic acid bacteria in cocoa fermentation processes. *FEMS Microbiology Reviews*, 44(4), 432–453. <https://doi.org/10.1093/femsre/fuaa014>

- De Vuyst, L. y Weckx, S. (2016). The cocoa bean fermentation process: from ecosystem analysis to starter culture development. *Journal of Applied Microbiology*(121), 5-17. <https://doi.org/10.1111/jam.13045>
- Dircks, H. (2009). Investigation into the fermentation of Australian cocoa beans and its effect on microbiology, chemistry and flavour. Sydney, Australia.
[doi:http://unsworks.unsw.edu.au/fapi/datastream/unsworks:8348/SOURCE01?view=true](http://unsworks.unsw.edu.au/fapi/datastream/unsworks:8348/SOURCE01?view=true)
- Dutan, S., Amaya, J., Frey, N. y Palacios, B. (2015). *Plan de desarrollo y ordenamiento territorial 2015-2020*. Gobierno Autónomo Decentralizado del cantón Vinces.
http://app.sni.gob.ec/sni-link/sni/PORTAL_SNI/data_sigad_plus/sigadplusdiagnostico/1260001030001_Diagnostico%20Territorial%20del%20Cant%C3%B3n%20Vinces%202015_2020_04-04-2016_15-59-59.pdf
- Echeverri, J. (2013). *Tecnología moderna en la producción de cacao: manual para productores orgánicos*. MAG (Ministerio de Agricultura y Ganadería de Costa Rica). [http://www.mag.go.cr/bibliotecavirtual/F01-10551\(3\).pdf](http://www.mag.go.cr/bibliotecavirtual/F01-10551(3).pdf)
- El Salous, A., Angulo, A. y Solís, L. (2019). Acceleration of cocoa fermentation through the action of bacteria (*Acetobacter aceti*) and yeast (*Saccharomyces cerevisiae*). *Espiraes revista multidisciplinaria de investigación científica*, 3(28), 1-20.
<https://doi.org/10.31876/er.v3i28.572>
- Figuerola, C., Mota, J. F., Hernández, Z., González, O., Cocolin, L. y Suárez, M. (2019). The challenges and perspectives of the selection of starter cultures for fermented

cocoa beans. *International Journal of Food Microbiology*, 301, 41-50.

<https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2019.05.002>

Fleitas, R. (1998). Cocoa Fermentations Conducted with a Defined Microbial Cocktail Inoculum. *Applied and Environmental Microbiology*, 44(4), 1477–1483.

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9546184/>

Fonseca, D., López, d., Ortíz, S., Nuñez, C. y Lozano, D. (2020). Effect of Addition of a Specific Mixture of Yeast, Lactic and Acetic Bacteria in the Fermentation Process to Improve the Quality and Flavor of Cocoa Beans in Colombia. *Pelita Perkebunan (Coffee and Cocoa Research Journal)*, 36(2), 154-172.

doi:<https://doi.org/10.22302/iccri.jur.pelitaperkebunan.v36i2.438>

Fowler, M. (2009). *Cocoa beans: from tree to factory*. In *Industrial Chocolate Manufacture and Use*, S.T. Beckett (Ed.).

<https://doi.org/10.1002/9781444301588.ch2>

Fowler, M. y Coutel, F. (2017). *Cocoa beans: from tree to factory*. En S. Beckett, M. Fowler, & G. Ziegler, *Beckett's Industrial Chocolate Manufacture and Use* (Fifth edition ed.). John Wiley & Sons Ltd. <https://doi.org/10.1002/9781118923597.ch2>

Gálvez, S., Loiseau, G. y Paredes, J. (2007). Study on the microflora and biochemistry of cocoa fermentation in the Dominican Republic. *International Journal of Food Microbiology*(114), 124-130. 10.1016/j.ijfoodmicro.2006.10.041

Ganeswari, I., Khairul Bariah, S., Amizi, M. y Sim, K. (2015). Effects of different fermentation approaches on the microbiological and physicochemical changes during cocoa bean fermentation. *International Food Research Journal*, 1(22), 70-76. [http://ifrj.upm.edu.my/22%20\(01\)%202015/\(11\).pdf](http://ifrj.upm.edu.my/22%20(01)%202015/(11).pdf)

GoogleEarth. (Enero de 2020). *earth.google.com*. [https://earth.google.com/web/@-0.38465357,-78.41494673,2713.56199476a,304.04833757d,35y,-](https://earth.google.com/web/@-0.38465357,-78.41494673,2713.56199476a,304.04833757d,35y,-175.35055969h,25.98110941t,0.00000001r)

[175.35055969h,25.98110941t,0.00000001r](https://earth.google.com/web/@-0.38465357,-78.41494673,2713.56199476a,304.04833757d,35y,-175.35055969h,25.98110941t,0.00000001r)

Hartel, R. y Hofberger, R. (2018). *Confectionery Science and Technology*. Switzerland: Springer International Publishing. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-61742-8>

Hatmia, R., Kobarsiha, M. y Cahyaningrum, N. (2015). Fungi Level Analysis of Cocoa Beans Based on Fermentation Box. *Procedia Food Science*, 3, 371-382. <https://doi.org/10.1016/j.profoo.2015.01.041>

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

INEN. (Febrero de 2018). *NORMA TÉCNICA ECUATORIANA NTE INEN 176 Quinta revisión*. Obtenido de <https://www.normalizacion.gob.ec/>: https://www.normalizacion.gob.ec/buzon/normas/nte_inen_176-5.pdf

INIAP. (1994). *Manual del cultivo de Cacao*. Quevedo: Quevedo, EC: INIAP, Estación Experimental Tropical Pichilingue. Obtenido de <http://repositorio.iniap.gob.ec/handle/41000/1621>

Kurtzman, C. (2011). *Torulasporea Lindner (1904). The Yeasts A Taxonomic Study*. Elsevier Science. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780444521491000756>

Lacerda, C., Ribero, D., Pedrozo, M. y Rosane, F. (2014). Impact of different cocoa hybrids (*Theobroma cacao* L.) and *S. cerevisiae* UFLA CA11 inoculation on

microbial communities and volatile compounds of cocoa fermentation. *Food Research International*, 44, 908-918.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodres.2014.08.033>

López, M., Criollo, J., Hernández, M. y Lozano, M. (2019). Physicochemical and microbiological dynamics of the fermentation of the CCN51 cocoa material in three maturity stages. *Revista Brasileira de Fruticultura*, 41(3), 1-13.

<https://dx.doi.org/10.1590/0100-29452019010>

MA-65. (2018). *Registro diario de parámetros climáticos 1998-2018. Base de datos Estación agrometeorológica IASA I. Sangolquí.*

Mayo, B. y Flórez, A. (2016). Lactic Acid Bacteria: *Lactobacillus* spp.: *Lactobacillus plantarum*. *Reference Module in Food Science*. Elsevier Ltd.

<https://doi.org/10.1016/B978-0-08-100596-5.00856-8>

Muñoz, A. y Gómez, S. (2020). "Análisis comparativo de la diversidad microbiana y la producción de compuestos bioquímicos de cacao (*Theobroma cacao* L.) Variedades nacional y trinitario ccn-51 durante la fermentación".: Universidad de las Américas. <http://dspace.udla.edu.ec/handle/33000/12186>

Nielsen, D. (2006). *The microbiology of Ghanaian cocoa fermentations*. Denmark: Department of Food Science, The Royal Veterinary and Agricultural University, Denmark.

Nielsen, Dennis, Craffack, M., Jespersen, L. y Mogens, J. (2013). The Microbiology of Cocoa Fermentation. En R. Watson, V. Preedy, y S. Zibadi, *Chocolate in Health and Nutrition* (págs. 39-60). Humana Press.

- Nigam, P. y Singh, A. (2014). Cocoa and Coffee Fermentations. En C. Batt, y M. Lou Tortorello, *Encyclopedia of Food Microbiology* (Second Edition ed., págs. 485-492). Elsevier Ltd.
- Nour, V. Trandafir, I., y Ionica, M. (2010). HPLC Organic Acid Analysis in Different Citrus Juices under Reversed Phase Conditions. *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca*, 38(1), 44-48.
<https://www.notulaebotanicae.ro/index.php/nbha/article/view/4569>
- Ooi, T., Ting, A. y Siow, L. (2020). Influence of selected native yeast starter cultures on the antioxidant activities, fermentation index and total soluble solids of Malaysia cocoa beans: A simulation study. *LWT - Food Science and Technology*, 122, 1-8.
<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0023643819313192?via%3Dihub>
- Ortansa, I. (2019). The microbiology of cocoa fermentation. En *Caffeinated and Cocoa Based Beverages* (págs. 423-446). Rumania: Elsevier Inc.
- Ouattaraa, H., Ouattaraa, H., Drouxb, M., Reverchonb, S., Nasser, W. y Niamke, S. (2017). Lactic acid bacteria involved in cocoa beans fermentation from Ivory Coast: Species diversity and citrate lyase production. *International Journal of Food Microbiology*, 256, 11-19.
https://www.researchgate.net/publication/317312712_Lactic_acid_bacteria_involved_in_cocoa_beans_fermentation_from_Ivory_Coast_Species_diversity_and_citrate_lyase_production
- Pitt, J., & Hocking, A. (2009). *Fungi and Food Spoilage* (Tercera ed.). Springer Science+Business Media. doi:10.1007/978-0-387-92207-2_4

- Predan, G., Lazar, D., & Lungu, I. (2019). Cocoa Industry-from plant cultivation to cocoa drinks production. En A. Grumezescu, & A. Butu, *Caffeinated and Cocoa Based Beverages* (págs. 489-507). Bucharest,: Woodhead Publishing.
doi:<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-815864-7.00015-5>
- Puerari , C., Teixeira, K., & Freitas, R. (2012). New cocoa pulp-based kefir beverages: Microbiological, chemical composition and sensory analysis. *Food Research International*, 48(2), 634-640. Obtenido de <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0963996912001974?via%3Dihub>
- Ramos, N., Castro, A., Juárez, J., de la Cruz, O., Rodríguez, N., Blancas, J., . . . Navarro, A. (2016). *Evaluación de ocratoxina a en Theobroma cacao l. "cacao blanco" durante el proceso de cosecha, fermentado, secado y almacenado*. Obtenido de <http://www.scielo.org.pe/pdf/rsqp/v82n4/a05v82n4.pdf>
- Romanensa, E., Freimüller, S., Volland, A., Stevens, M., Krähenmann, U., Isele, D., Fischer, B., Meile, L., Schwenninger, S. (2019). Screening of lactic acid bacteria and yeast strains to select adapted antifungal co-cultures for cocoa bean fermentation. *International Journal of Food Microbiology*, 290, 262-272.
doi:<https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2018.10.001>
- Salazar, L. (2017). *Aislamiento y caracterización de microorganismos durante el proceso de fermentación de Theobroma cacao L. de la variedad "Chuncho" obtenida en Cuzco, Perú*. Universidad Peruana Cayetano Heredia. Repositorio Institucional.

http://repositorio.upch.edu.pe/bitstream/handle/upch/1436/Aislamiento_SalazarAlvarez_Lilian.pdf?sequence=1&isAllowed=y

- Santander, M., Rodríguez, J., Vaillant, F., y Escobar, S. (2019). An overview of the physical and biochemical transformation of cocoa seeds to beans and to chocolate: Flavor formation. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 60(10), 1593-1613. doi:<https://doi.org/10.1080/10408398.2019.1581726>
- Schwan, R., y Wheals, A. (2004). The Microbiology of Cocoa Fermentation and its Role in Chocolate Quality. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*(44), 205-221.
- Senanayake, M., Jansz, E., y Buckle, K. (1997). Effect of Different Mixing Intervals on the Fermentation of Cocoa Beans. *J Sci Food Agric*, 42-48.
[https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0010\(199705\)74:1%3C42::AID-JSFA768%3E3.0.CO;2-U](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0010(199705)74:1%3C42::AID-JSFA768%3E3.0.CO;2-U)
- Thuy Ho, V., Fleet, G., y Zhao, J. (2018). Unravelling the contribution of lactic acid bacteria and acetic acid bacteria to cocoa fermentation using inoculated organisms. *International Journal of Food Microbiology*(279), 43-56.
<https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2018.04.040>
- Torres, L. (2012). *Manual de producción de cacao fino de aroma a través de manejo ecológico*. Universidad de Cuenca. Repositorio Institucional UC.
<http://dspace.ucuenca.edu.ec/bitstream/123456789/3250/1/TESIS.pdf>
- UCDavis. (2010). *Hanseniaspora uvarum*. UC Davis Viticulture and Enology.
<https://wineserver.ucdavis.edu/industry-info/enology/wine-microbiology/yeast-mold/hanseniaspora-uvarum>

- Viesser, J., Pereira, G., de Carvalho, D., Vandenberghe, L., Azevedo, V., Brenig, B., de Carvalho, D., Rogez, H., Góes-Neto, A., Soccol, C. (2020). Exploring the contribution of fructophilic lactic acid bacteria to cocoa beans fermentation: isolation, selection and evaluation. *Food Research International*, 136. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2020.109478>
- Voigt, J. (2013). Chocolate and Cocoa Aroma. En R. Watson, V. Preedy, & S. Zibadi, *Chocolate in Health and Nutrition* (Primera ed., págs. 89-93). Humana Press. doi:10.1007 / 978-1-61779-803-0
- Wacher, M. d. (2011). Microorganismos y chocolate. *Revista Digital Universitaria*, 12(4), 1-9. <http://www.revista.unam.mx/vol.12/num4/art42/art42.pdf>
- Zambrano, G. (Septiembre de 2018). *Evaluación de la influencia del proceso de beneficio del cacao (Theobroma cacao) CCN-51 de altura en su calidad final, mediante el análisis físico, físico-químico y sensorial*. Universidad Central del Ecuador. <http://www.dspace.uce.edu.ec/bitstream/25000/16624/1/T-UCE-0008-CQU-044.pdf>