



ESPE
UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS
INNOVACIÓN PARA LA EXCELENCIA

**Caracterización bioquímica de almendra fermentada de cacao (*Theobroma cacao*) var. CCN- 51,
pre-inoculada con un cultivo iniciador bacteriano**

Jaramillo Vargas, Thalía Belén

Departamento de Ciencias de la Vida y la Agricultura

Carrera de Ingeniería Agropecuaria

Trabajo de titulación, previo a la obtención del título de Ingeniera Agropecuaria

Ing. Falconí Saá, César E. PhD.

8 de abril del 2021

Urkund Analysis Result

Analysed Document: D99273940 Título del trabajo de titulación
 Caracterización bioquímica de almendra fermentada de cacao
 (Theobroma cacao) var. CCN 51, pre-inoculada con un cultivo iniciador
 bacteriano

aprobado.pdf (D54403984) Submitted: Fecha y hora 24.03.2021;
 19.05

Submitted By: César E. Falconí Saá correo institucional cefalconi@espe.edu.ec
 Significance: 4 %

Sources included in the report:

"ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD MICROBIANA DURANTE EL PROCESO DE FERMENTACION EN
 HIBRIDOS ...

Document "ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD MICROBIANA DURANTE EL PROCESO DE FERMENTACION
 EN HIBRIDOS ... (D28191852) 1

URL: <https://www.revistaespirales.com/index.php/es/article/download/572/464> 2

URKUND WINSTON ÁVILA.doc Document URKUND WINSTON ÁVILA.doc (D82902189) 1

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

Document TESIS FINAL Roberto Haro_CFS-Urkund.docx (D99223302) 11

tesis agraria.doc Document tesis agraria.doc (D20953212) 1

JESSICA ARANGO ANGARITA 2016.pdf Document JESSICA ARANGO ANGARITA 2016.pdf (D76429600)

URL: <https://docplayer.es/136610161-Escuela-universitaria-de-posgrado.html> 2

URL: <https://repositorio.uteq.edu.ec/bitstream/43000/2074/1/T-UTEQ-0061.pdf> 2

URL: [https://www.swisscontact.org/_Resources/Persistent/d/3/b/f/d3bfb5a8d042f05cbf5533 ...](https://www.swisscontact.org/_Resources/Persistent/d/3/b/f/d3bfb5a8d042f05cbf5533...) 1

URL: <https://core.ac.uk/download/pdf/287329181.pdf> 1

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...) 1

URL: [https://docplayer.es/amp/86321355-Tesis-para-obtener-el-titulo-de-licenciado-en-bi ...](https://docplayer.es/amp/86321355-Tesis-para-obtener-el-titulo-de-licenciado-en-bi...) 1

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, “**CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA DE ALMENDRA FERMENTADA DE CACAO (THEOBROMA CACAO) VAR. CCN 51, PRE-INOCULADA CON UN CULTIVO INICIADOR BACTERIANO**” fue realizado por el señor **Jaramillo Vargas, Thalia Belén** 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 digitalmente por:
**CESAR EDUARDO
FALCONI SAA**

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



ESPE
UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS
INNOVACIÓN PARA LA EXCELENCIA

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA Y LA AGRICULTURA

CARRERA DE INGENIERIA AGROPECUARIA

RESPONSABILIDAD DE AUTORÍA

Yo, **Jaramillo Vargas Thalía Belén**, con cédula/cedulas de ciudadanía n° 1752793644, declaro que el contenido, ideas y criterios del trabajo de titulación: **“Caracterización bioquímica de almendra fermentada de cacao (*Theobroma cacao*) var. CCN 51, pre-inoculada con un cultivo iniciador bacteriano”** 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, 8 abril del 2021

Firma

Jaramillo Vargas Thalía Belén

C.C.: 1752793644



DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA Y LA AGRICULTURA

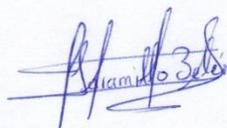
CARRERA DE INGENIERIA AGROPECUARIA

AUTORIZACIÓN DE PUBLICACIÓN

Yo, **Jaramillo Vargas Thalía Belén**, con cédula de ciudadanía n° 1752793644, autorizo a la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE publicar el trabajo de titulación: **“Caracterización bioquímica de almendra fermentada de cacao (*Theobroma cacao*) var. CCN 51, pre-inoculada con un cultivo iniciador bacteriano”** en el Repositorio Institucional, cuyo contenido, ideas y criterios son de mi responsabilidad.

Sangolquí, 8 de abril 2021

Firma



.....
Jaramillo Vargas Thalía Belén

C.C.: 1752793644

Dedicatoria

A Dios, por guiarme y cuidar de las personas que amo.

A mi madre, mi razón de vivir, mi ejemplo a seguir y mi más valioso tesoro.

A mi padre, hermana y sobrino, mis razones para ser mejor persona cada día.

A mis verdaderos y mejores amigos, quienes me han brindado su tiempo, cariño y han confiado en mí incondicionalmente.

A ti H., por cuidarme, quererme y apoyarme. Por sacar mi mejor versión.

Simplemente sin ustedes, nada de esto de esto sería posible, los amo.

Belén Jaramillo

Agradecimientos

Agradezco profundamente a mi director de proyecto, César E. Falconí Saá., PhD, un excelente docente y profesional, quien me brindó su conocimiento y tiempo, y supo apoyarme y confiar en mí para llevar a cabo este proyecto.

A la Doctora Viviana Yáñez, docente de la Universidad de las Américas, quien me permitió aprender de ella y me brindó su cariño y apoyo incondicional.

Al Ingeniero Patricio Pérez y Juan Tigreiro, quienes además de ser excelentes docentes, son personas de noble corazón y, supieron aconsejarme y apoyarme en mi desarrollo profesional y académico, gracias por ser unos amigos.

A mis compañeros de tesis Roberto Haro y Darwin Claudio, quienes siempre están dispuestos a dar lo mejor de sí mismos, gracias por ser un verdadero equipo, por todas las risas compartidas y los buenos momentos juntos.

A Santiago Cuesta, Carlos Saquina y familia, mis amigos de toda la vida, siempre serán muy importantes para mí, gracias por el cariño, la confianza y el apoyo incondicional que han brindado a mi familia y a mí.

A ti H. Gracias por quererme bonito, por apoyarme en cada pequeño paso que doy, por cuidarme a pesar de ser obstinada y sobre todo por creer en mí.

A Gabriel Rodríguez, mi mejor amigo y confidente, gracias escucharme y entenderme sobre todo en los malos momentos, por ayudarme a crecer como persona y siempre estar para mí.

A mi padre y hermana, quienes siempre me han cuidado y llenado de sabios consejos, gracias por haberme enseñado las mejores lecciones de vida.

Y agradezco sobre todo a mi madre, Elvia Vargas quien ha luchado cada día para brindarme lo necesario, me ha amado, cuidado y acompañado incondicionalmente en cada una de las etapas de mi vida y me han enseñado lo valioso que es saber ser buena persona. Gracias por ser la mejor madre que puedo tener.

A todos mis amigos, docentes y personal de la ESPE –IASA que supieron brindarme su tiempo, cariño y apoyo. Muchas Gracias

Índice de contenido

Carátula.....	1
Reporte Urkund.....	2
Certificación.....	3
Responsabilidad de Autoría.....	4
Autorización de Publicación.....	5
Dedicatoria.....	6
Agradecimiento.....	7
Índice de contenido	8
Índice de tablas.....	12
Índice de figuras.....	13
Resumen.....	14
Abstract.....	15
Capítulo I	16
Introducción	16
Antecedentes	16
Justificación	17
Objetivos	19
<i>Objetivo general</i>	<i>19</i>
<i>Objetivos específicos</i>	<i>20</i>
Hipótesis	20

<i>Hipótesis nula</i>	20
<i>Hipótesis alterna</i>	20
Capítulo II	21
Marco teórico	21
Cacao generalidades e importancia industrial cacao.....	21
<i>Historia del cacao y el chocolate</i>	21
<i>Producción e industrialización del cacao</i>	22
<i>Descripción botánica y ecológica</i>	24
<i>Variedades cultivadas</i>	25
Cacao fino de aroma.....	25
Cacao forastero.....	26
Cacao trinitario.....	26
Pos cosecha	27
<i>Factores que influyen en la calidad de la materia prima</i>	27
<i>Fermentación</i>	28
Etapa de hidrólisis o fase alcohólica.....	29
Etapa de fermentación acética.....	30
Etapa de oxidación.....	30
<i>Secado</i>	31

	10
Métodos de fermentación	31
Diversidad microbiológica y bioquímica del cacao.....	32
Generación de los precursores del sabor.	32
Proteínas.....	32
Carbohidratos.....	33
Polifenoles.....	33
Microorganismos y factores circundantes.	34
Levaduras.....	35
Bacterias ácido lácticas.....	35
Bacterias ácido acéticas.....	35
Capítulo III	36
Materiales y Métodos	36
Área de muestreo	36
Monitoreo y muestreo de almendra de cacao fermentado	36
Inoculación de levaduras y bacterias	37
Análisis físico-químicos.....	37
Análisis bioquímicos.....	38
Cuantificación de Ácidos orgánicos (Ácido láctico, oxálico, cítrico, málico, acético)	38
Cuantificación de azúcares (glucosa, sacarosa y fructosa)	39

	11
<i>Cuantificación del Contenido total de polifenoles</i>	40
Análisis microbiológicos, cuantificación de la dinámica poblacional	41
Prueba de corte	41
Diseño experimental	42
Análisis de la información	43
Capítulo IV	44
Resultados y Discusión	44
Parámetros físicos- químicos	44
Cuantificación de la dinámica poblacional	45
Cuantificación de azúcares (glucosa, sacarosa y fructosa)	50
Cuantificación de Ácidos orgánicos (Ácido láctico, oxálico, cítrico, málico, acético).	53
Cuantificación del Contenido total de polifenoles	58
Prueba de corte	58
Capítulo V	60
Conclusiones y Recomendaciones	60
Conclusiones	60
Recomendaciones	62
Referencias bibliográficas	63

Índice de tablas

Tabla 1 <i>Ingreso en USD, por exportaciones de Cacao en grano y semielaborados</i>	23
Tabla 2 <i>Preparación de curvas de calibración</i>	39
Tabla 3 <i>Promedio \pm desviación estándar del pH y temperatura, en almendras de cacao CCN 51, pre-inoculadas con un cultivo iniciador bacteriano, durante 96 horas de fermentación</i>	43

Índice de figuras

Figura 1 <i>Croquis experimental</i>	43
Figura 2 <i>Cambios de crecimiento poblacional en almendras en ausencia y presencia del pre-inóculo durante 96 horas de fermentación</i>	47
Figura 3 <i>Cambios en la concentración de azúcares en ausencia y presencia del pre-inóculo durante 96 horas de fermentación de almendra de cacao CCN-51</i>	52
Figura 4 <i>Cambios en la concentración de ácidos orgánicos en ausencia y presencia del pre-inóculo durante 96 horas de fermentación</i>	56
Figura 5 <i>Concentración de ácido oxálico en almendra de cacao pre-inoculada con un cultivo iniciador, durante 96 horas de fermentación</i>	58
Figura 6 <i>Porcentaje de Fermentación de almendras de cacao a las 96 horas de fermentación</i>	59

Resumen

El aroma y la calidad final de las almendras de cacao está definido por compuestos bioquímicos, que se forman durante el proceso de fermentación como resultado de procesos microbianos. Por esta razón esta investigación analiza la producción de precursores aromáticos, conjuntamente con la cinética de la fermentación espontánea y el papel de un cultivo iniciador con *Torulaspota dulbruecki*, *Hanseniaspora uvarum* (levaduras), *Lactobacillu plantarum* (Bacteria ácido láctica) y *Acetobacter ghanensis* (Bacteria ácido acética). La cuantificación de azúcares y ácidos orgánicos se realizó por Cromatografía Líquida de Alta eficiencia (HPLC) y, de polifenoles por el método de Follin. Durante las primeras 48 horas de fermentación, la población de levaduras y la actividad enzimática fue mayor en las muestras de cacao pre-inoculadas, lo que aceleró la hidrólisis de la sacarosa e incrementó el contenido de glucosa y fructosa disponible en la pulpa. Sin embargo, la concentración de glucosa disminuyó abruptamente después de las 24 horas de fermentación para ambos tratamientos. Concomitantemente, incrementó la actividad de Bacterias ácidos lácticos (BAL) al igual el contenido de lactato, lo que se correlacionó con la disminución de ácido cítrico y fructosa de la masa fermentante. Al emplear *Lactobacillus plamtarum* como parte del cultivo iniciador, su crecimiento fue favorecido por el alto contenido disponible de fructosa, por lo que la población de BAL fue ligeramente mayor en las muestras pre-inoculadas. El contenido de acetato incrementó durante el proceso fermentación, siendo ligeramente menor en las muestras pre-inoculadas. El efecto de los ácidos orgánicos y la actividad microbiana permitió alcanzar un pH entre 4-4.5 y una temperatura mayor a los 45 °C en las muestras pre inoculadas, brindando las condiciones óptimas para la permeabilización de la almendra y la síntesis de precursores, teniendo como resultado final el 80 % de almendras bien fermentadas.

Palabras claves: *fermentación de cacao, bacterias ácido lácticas, bacterias ácido acéticas, levaduras.*

Abstract

The aroma and final quality of cocoa beans is defined by biochemical compounds, which are formed during the fermentation process as a result of microbial processes. For this reason, this research analyzes the production of aromatic precursors, together with the kinetics of spontaneous fermentation and the role of a starter culture with *Torulaspota dulbruecki*, *Hanseniaspora uvarum* (yeasts), *Lactobacillu plantarum* (lactic acid bacteria) and *Acetobacter ghanensis* (acid bacteria acetic). The quantification of sugars and organic acids was carried out by High Efficiency Liquid Chromatography (HPLC) and of polyphenols by the Follin method. During the first 48 hours of fermentation, the yeast population and the enzymatic activity were higher in the pre-inoculated cocoa samples, which accelerated the hydrolysis of sucrose and increased the content of glucose and fructose available in the pulp. However, the glucose concentration decreased abruptly after 24 hours of fermentation for both treatments. Concomitantly, the activity of lactic acid bacteria increased as well as the lactate content, which was correlated with the decrease in citric acid and fructose in the fermenting mass. When using *Lactobacillus plamtarum* as part of the starter culture, its growth was favored by the high available content of fructose, so the BAL population was slightly higher in the pre-inoculated samples. The acetate content increased during the fermentation process, being slightly lower in the pre-inoculated samples. The effect of organic acids and microbial activity allowed reaching a pH between 4-4.5 and a temperature greater than 45 °C in the pre-inoculated samples, providing the optimal conditions for the permeabilization of the almond and the synthesis of precursors, having as final result 80% of well fermented almonds.

Keywords: *cocoa fermentation, lactic acid bacteria, acetic acid bacteria, yeasts*

Capítulo I

Introducción

Antecedentes

El cacao CCN-51 es altamente demandado por la industria chocolatera, siempre que presente características deseables durante su proceso de elaboración y como producto final. Durante las operaciones de manejo de cacao CCN-51, la fermentación es considerado como unas de las fases más importante para el desarrollo de los precursores de aroma y sabor del chocolate.

El proceso de fermentación se divide en dos etapas: la etapa anaeróbica en la cual la pulpa es degradada por la acción enzimática de levaduras y algunos bacillus, que a su vez transforman los azúcares disponibles a etanol conjuntamente con la participan de Bacterias ácido lácticas encargadas de producir lactato y manitol; y la etapa aeróbica que se da por un incremento de oxígeno lo que permite el desarrollo de bacterias ácidos acéticas encargadas de sintetizar acetato, el cual al ingresar a los cotiledones incrementa la permeabilización de membrana subcelular, promoviendo importantes cambios físico-químicos en la almendra, que influyen notablemente en el sabor final del chocolate (Salous et al. 2019).

Muñoz y Gomez 2020, afirman que los microorganismos que predominan en función del tiempo de fermentación son *Saccharomyces cerevisiae*, *Hanseneispora oportunitae*, *Candida krusei* y *Pichia kudriavzevii*, levaduras abundantes durante los primeros dos días de la fermentación, seguido por bacterias del género *Lactobacillus spp*, *Acetobacter spp.*, bacterias esporuladas del género *Bacillus*, al igual que hongos filamentosos y esporulados que se presentan en mayor concentración al final de la fermentación, tales como *Aspergillius spp.* y *Fusarium spp.* Producto de estudios sobre aceleración de la fermentación de cacao a través de la bacteria *Acetobacter aceti* y la levadura *Saccharomyces cerevisiae*, Salous (2019) obtuvo el 72 %

de granos bien fermentados, disminuyendo el crecimiento de moho y granos pizarrosos. El uso de *S. cerevisiae* var. Chevalieri durante la fermentación, incrementó el contenido de alcohol y alcanzó su pico de concentración a las 96 horas, así como el contenido de acetato, aceleró las reacciones bioquímicas internas de la almendra y redujo el tiempo, a diferencia de la fermentación sin la participación de microorganismos (Chempacak 2014). La presencia de bacterias ácido lácticas permite el control de la acidez y pH de la masa fermentante, además de que a partir de azúcares y ácido cítrico producen ácido láctico y manitol respectivamente, sustratos utilizados al igual que el etanol por bacterias ácido acéticas para sintetizar acetoina y ácido acético (Ho et al.2015). Moens et al. 2014, observó que todas las cepas de AAB difieren en su cinética de oxidación, por lo que solo *Acetobacter pasteurianus* realizó una oxidación rápida de etanol y ácido láctico a ácido acético y acetoina, acelerando la fermentación de cacao. Estos estudios entre otros, indican que la aplicación de cultivos iniciadores a base de microorganismos beneficiosos permite optimizar el proceso de fermentación, lo que resulta en un incremento de la calidad de la almendra y disminución del periodo de fermentación.

Justificación

La producción y comercialización cacaotera es la base económica de muchos países en vías de desarrollo. De los granos de cacao se obtienen productos tales como pasta, licor, manteca o polvo de cacao que son empleados como materia prima para la elaboración de productos finales, siendo el principal el chocolate, el cual es un alimento altamente nutritivo y apetecido en muchos países.

A nivel mundial el cacao se produce en 50 países distribuidos en América, Asia y África. Según datos proporcionados por la ICCO, posteriores al año 2000 se ha observado un crecimiento constante de su producción, lo que se atribuye a la disponibilidad de mejores

técnicas en su manejo e incremento del área productiva y comercialización; para el año 2018 la producción de cacao a nivel mundial superó los 4.700 millones de toneladas, con un rendimiento promedio por hectárea de aproximadamente 4.300 Kg, lo cual demuestra la importancia de este producto a nivel mundial.

En Ecuador, el cacao es una de las especies agroforestal de mayor importancia económica por su alta demanda en la industria alimenticia, su producción en el Litoral y la Amazonía es una actividad generadora de empleo, ya que actualmente la realizan el 5 % de la Población Económicamente activa rural, siendo fundamental para la economía familiar de estas regiones. Se cultiva principalmente en las provincias de Carchi, Imbabura, El Oro, Santo domingo de los Tsáchilas, Morona Santiago entre otras. En el año 2018, Ecuador alcanzó una producción superior a 286 toneladas, con un rendimiento de 0,62 toneladas/ha; las variedades más cultivadas son: Trinitario clon CCN-51 y cacao fino de aroma o también conocido como cacao Nacional, las cuales participan con el 72 % y 28 % respectivamente en la producción total nacional, y aportan con el 7% de la producción mundial (Falconí y Yáñez 2007; MAG, 2018).

Falconí y Yáñez (2007) y Ginatta et al. (2018) mencionan que el cacao fino de aroma, por tener características organolépticas, físicas y químicas privilegiadas, ha llegado a ser un producto de interés en mercados internacionales, sin embargo, por características productivas beneficiosas para los productores, el cacao Trinitario clon CCN 51 se ha convertido en la principal variedad de exportación ecuatoriana (Anecacao, 2019).

Debido a factores genéticos, el cacao CCN-51 no presenta el sabor y aroma de “arriba” tradicionalmente encontrado en el cacao Nacional, durante los últimos años la investigación se ha centrado en la mejora de procesos productivos tales como: la fertilización, control de plagas y enfermedades. Sin embargo, los procesos de pos cosecha en cacao son aquellos que

determinan en gran medida la calidad final de la almendra, siendo la etapa más importante la fermentación, debido a que da paso a cambios físicos y bioquímicos que definen el sabor y aroma, entre otras características; por lo tanto el deficiente y limitado desarrollo tecnológico, factores como la heterogeneidad en el grado de fermentación, tipo de cacao, tipo de fermentador, tiempo de fermentación, frecuencia de remoción y volumen total de la masa fermentante, pueden afectar el proceso de fermentación de cacao (*Theobroma cacao*), obteniendo principalmente granos mal fermentados lo que inciden directamente sobre las características organolépticas y calidad final de la almendra, que concomitantemente afecta el precio de comercialización y el mercado (Teneda, 2016).

En este sentido, la aceleración de procesos químicos mediante la adición de microorganismos, como cultivos iniciadores, permite disminuir el tiempo de la fermentación, e incrementa la posibilidad de mejorar la calidad del producto final (Salous et al. 2019). Sin embargo, el uso de microorganismos controlados, inducirán una diversidad de compuestos bioquímicos del grano, por lo que se requiere conocer cómo influye dicho microbiota en la fermentación del grano. Hecho que impulsa al desarrollo de la presente investigación con la finalidad de obtener beneficios para la mejora de la cadena de valor de cacao tanto como la calidad del producto final.

Objetivos

Objetivo general

Evaluar el efecto de cultivos iniciadores microbianos inoculados, sobre la composición bioquímica de cacao (*Theobroma cacao*) var. CNN 51, durante el proceso de fermentación mediante técnicas cromatográficas (HPLC) y espectrofotometría.

Objetivos específicos

Determinar la dinámica poblacional de la microbiota en cacao var. Trinitario clon CCN 51, en relación al proceso fermentativo de la almendra, por conteo de colonias en placa.

Cuantificar el contenido de ácidos orgánicos, azúcares y polifenoles en granos de cacao de la var. Trinitario clon CCN-51, mediante cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC) y espectrofotometría.

Comparar el contenido de ácidos orgánicos, azúcares y polifenoles respecto a la dinámica poblaciones de la masa fermentada de cacao var. Trinitario clon CCN 51.

Hipótesis***Hipótesis nula***

El uso de cultivos iniciadores microbianos inoculados en el proceso de fermentación no incrementa el contenido de ácidos orgánicos, azúcares y polifenoles en cacao (*Theobroma cacao*) var. TRINITARIO clon CCN-51.

Hipótesis alterna

El uso de cultivos iniciadores microbianos inoculados en el proceso de fermentación incrementa el contenido de ácidos orgánicos, azúcares y polifenoles en cacao (*Theobroma cacao*) var. TRINITARIO clon CCN-51.

Capítulo II

Marco teórico

Cacao generalidades e importancia industrial cacao

Historia del cacao y el chocolate

El cacao es un cultivo de importancia agrícola y comercial, los registros históricos indican que se originó en Centro América, entre México, Guatemala y Honduras; sin embargo, otros autores atribuyen como centro de origen a América del sur, como Colombia, Ecuador, Perú y Brasil, donde se ha encontrado alta variabilidad en frutos. Los pueblos precolombinos Mayas y Aztecas, son los primeros en consumir cacao, en forma de bebida llamada “xocoalt, la cual era destinada a las clases sociales de élite de cada civilización; además de emplear los granos como moneda de intercambio (Anecacao 2015; Bastidas L. 2009).

Posterior a la colonización, la creciente demanda por el cultivo en Europa y su alta rentabilidad durante el siglo XVI, causó la expansión del cultivo a países como Brasil y Ghana en el continente africano, pasando a denominarse como pepa de oro (ANECACAO 2015; Falconí et al.2007). En el siglo XVII, plantas de cacao fueron llevadas hacia México y Filipinas, dando origen a la raza Java Criollo, posteriormente fue introducido en Venezuela, lo que permitió la cruce entre cacao criollo y forastero, obteniendo la variedad hoy conocida como cacao trinitario. Para el siglo XIX Suiza estableció su industria chocolatera siendo el primer país en agregar leche a la preparación del chocolate; a finales del mismo siglo, las plantaciones de Ghana, se expandieron a otros países de África, como Nigeria, Costa de Marfil y el Congo Belga, con un rápido crecimiento productivo, llegando a ser el responsable del 60 % de la producción mundial (Falconí et al. 2007; Enríquez 2010).

El cultivo de cacao en Ecuador, se desarrolló en las grandes haciendas cacaoteras ubicadas en Vinces y en otros cantones de la provincia de Los Ríos, expandiéndose a las planicies de la costa y el oriente ecuatoriano; la producción masiva de este producto empezó desde los años 1880, convirtiéndose en el mayor exportador mundial de cacao, sin embargo para inicios del siglo XX, debido a la aparición y diseminación de enfermedades como la Monilla y Escoba de Bruja se redujo abruptamente la producción, provocando un periodo de depresión e inestabilidad económica en el país (ANECACAO 2015).

En la actualidad, Ecuador cultiva cacao Nacional y Trinitario, registrando un crecimiento constante de la producción. Teneda (2016), señala que el cacao representa el tercer rubro de exportación agrícola del país y constituye una fuente de ingreso para más de 100 000 pequeños productores de Esmeraldas, la Amazonía, los Ríos, Guayas y Manabí, además menciona que el 75% del cacao fino de aroma es exportado por nuestro país.

Producción e industrialización del cacao

A nivel mundial, la producción cacaotera es dominada por Costa de Marfil, que aportó con el 43 % a la producción mundial en el año 2018, seguido por Ghana, Indonesia, Brasil y Nigeria. La elevada demanda por parte de la industria, ha generado un incremento de las importaciones de cacao en grano, con un crecimiento promedio del 6,3% anual, sin embargo para el último año, el cacao en grano tuvo un crecimiento de 18,0%, entre los principales países importadores. En cuanto a las exportaciones de cacao en grano a nivel mundial, estas se han mantenido con una dinámica creciente del 8.8 % promedio anual (Minagri 2019).

El cacao ecuatoriano es valorado por su característico aroma y sabor, que son favorecidos por las condiciones climáticas del país. La importancia de su producción, se evidencia al ser un cultivo permanente que dispone de una superficie de siembra mayor a

498.794 ha, con una producción de 309.066 toneladas, y un rendimiento de 0.662 T/ha, llegando a exportar en grano crudo y tostado 294.063 toneladas, que dieron un ingreso total de 665 millones USD FOB en el 2018 (MAG, 2020) (Tabla 1).

Tabla 1

Ingreso en USD, por exportaciones de cacao en grano y semielaborados

Producto	USD FOB
Cacao en grano	665.177.314
Manteca de cacao	34.772.849
Licor de cacao	33.003.845
Chocolate	29.340.629
Cacao en Polvo	13.596.892
Grasa y aceite de cacao	671.448
Pasta de cacao	469.595

Fuente: (MAG, 2020)

A nivel mundial se exportan 3.3 millones de toneladas de cacao en grano, siendo el 15% aporte directo de América Latina y el Caribe. En América del Sur, Brasil y Ecuador son los principales productores, sin embargo, sus rendimientos varían debido a la sensibilidad del cultivo a los factores climatológicos, que condicionan la incidencia de plagas.

Ecuador ha llegado a ubicarse como el cuarto exportador de cacao a nivel mundial y el primer exportador de cacao fino de aroma, después de Costa de marfil, Ghana e Indonesia, quienes abarcan alrededor del 70% de la producción global (Teneda 2016).

Para el mismo año los semielaborados como; licor, pasta, polvo y manteca de cacao, representaron alrededor del 6 % del suministro total exportado de cacao, destinado principalmente a la Unión Europea y Estados Unidos (ANECACAO, 2019).

El chocolate es un producto que se obtiene mezclando pasta y manteca de cacao con azúcar, a la cual se puede añadir otros ingredientes como leche o frutos secos, que originan un sin número de variedades conocidas el día de hoy, como el chocolate negro o blanco (Costaguta, 2008). El consumo de chocolate se ha intensificado en el último siglo, manteniendo la tradición de ser consumido en forma de bebida; se estima un consumo per cápita de 0.3 Kg en Ecuador, siendo inferior al consumo de otros países, como Estados Unidos que se aproxima a los 5 Kg o 10 Kg en Suiza, con un incremento en 3% del consumo en países europeos (EL Telégrafo, 2008).

La industria ecuatoriana, se ha enfocado en la combinación de chocolate con productos naturales como: el banano, granadilla, quinua y aceites, o frutas tropicales, entre ellas maracuyá, piña o mango, que han dado origen a industrias como Pacari, Hoja verde, Kallari, Choco Art, quienes también ofertan mezclas chocolateras con ají, hierbaluisa, jengibre, mortiño y uvilla, lo que les ha permitido consolidar una imagen para el ingreso al mercado internacional (ANECACAO, 2015).

Descripción botánica y ecológica

En Ecuador el cacao se cultiva en altitudes desde el nivel del mar hasta los 1200 msnm., en zonas de clima húmedo con precipitaciones entre los 2000 hasta los 4000 mm al año; la plantación también requiere de una estación seca, menor a dos meses y medio, y temperaturas entre los 22 °C a 24 °C, tolerando una temperatura mínima de 15 °C y máxima de 35°C (Quingaísa y Riveros 2007).

El cultivo se desarrolla en suelos profundos, fértiles y bien drenados, de preferencia de topografía plana o con pendientes no superiores al 30 %, y pH entre 5.5 a 6 (Batista 2009).

El cacao (*Theobroma cacao* L.), pertenece a la familia Sterculiaceae, género Theobroma. Es un árbol pequeño de una altura de 5 a 8 m, aunque puede llegar a alcanzar una altura superior a los 10 metros bajo sombra (Quintero y Díaz 2004).

Los árboles de cacao presentan su primer molinillo u horqueta a una altura de 0,8 a 1,2 m, a partir del cual nace de 3 a 6 ramas principales que forman el esqueleto de árbol; el cual está conformado por hojas simples de pigmentación variada entre verde, morado o rojizo. Posee una raíz pivotante que puede llegar a profundizar hasta 2 m del suelo, con raíces secundarias que crecen entre los primeros 25 cm de profundidad (Enríquez 2010).

Las inflorescencias se localizan en la base de las hojas, son flores conspicuas de tamaño pequeño, es un árbol cauliflor debido a que la floración se da en los troncos maduros entre el tercer al quinto año de edad (Enríquez 2010).

El fruto contiene entre 30 a 40 semillas, dependiendo de la variedad, su coloración es marrón-rojizo, y están rodeadas por una pulpa aromática, rica en azúcares, ácido cítrico y sales (Teneda 2016). Durante el proceso de fermentación la pulpa es removida e hidrolizada por microorganismos (levaduras y bacterias) dando como producto un exudado que puede ser empleado en otros procesos industriales. El embrión está formado por dos grandes cotiledones, los cuales son ricos en teobromina y cafeína, en porcentajes de 0,5 al 1 % respectivamente (Quintero y Díaz 2004).

Variedades cultivadas

Cacao fino de aroma. El cacao criollo o mejor conocido como cacao fino de aroma fue domesticado en diferentes regiones de América, es una planta de poco vigor y bajo rendimiento, susceptible a enfermedades, sin embargo por la calidad de las almendras y sus particulares características organolépticas, es apetecido por el mercado internacional; al igual que la

variedad trinitaria, las cuales se han utilizado en mezclas con granos de la variedad Forastero para la elaboración de chocolates finos (Quintero y Díaz 2004).

La variedad se caracteriza por tener inflorescencias cuyos filamentos son de color rojo, con pétalos blanquecinos y de fondo verduzco, su fruto es de coloración amarilla cuando ha alcanzado el estado de madurez; presenta lomos lisos que se unen al extremo inferior de la mazorca formando el llamado pico de loro (Quingaísa y Riveros 2007).

Las semillas son de color morado claro, las cuales se tornan amarillentas después de la fase de secado, son ligeramente amargas y astringentes y su mucílago posee un mayor contenido de azúcares que otras variedades. El fruto puede presentar entre 33 a 45 semillas, con un peso de 1,2 a 1,7 g/semilla (Falconí et al.2007).

Cacao forastero. La variedad forastera se caracteriza por ser plantas con mayor tolerancia a plagas y enfermedades, con mayor productividad y adaptabilidad de climas diversos, en comparación al cacao Nacional, lo que lo ha vuelto atractivo para los productores, llegando a representar el 95% de la producción mundial, razón por la cual también es considerado como cacao ordinario, utilizado principalmente para la fabricación de manteca de cacao y productos de chocolates (Quintero y Díaz 2004).

La inflorescencia que presenta esta variedad es de color violeta, sus frutos son de color verde con cascara gruesa y bien lignificada y sus semillas son de color purpura oscuro aplastadas, y requieren de un periodo de fermentación de 5 a 6 días (Falconí et al. 2007).

Cacao trinitario. Esta variedad es el resultado de la cruce de las variedades Forastero y Criollo, se produce en Trinidad y Tobago, Colombia, Venezuela y América central y se caracteriza por ser más productivo y tener una mejor resistencia a plagas que el cacao Criollo, sin embargo, la calidad de sus granos es inferior (Quintero y Díaz 2004).

Las semillas son grandes de color marrón rojizo, con un aspecto blanquecino al terminar la fase de secado y sus mazorcas son de pigmentación roja, su inflorescencia se caracteriza por ser de color rosa pálido. Sus granos requieren entre 2 a 3 para fermentar (Falconí et al. 2007).

Dentro de esta variedad tenemos al cacao clonado CCN-51 que significa Colección Castro Naranjal, cuyo origen se atribuye al agrónomo ambateño Homero Castro Zurita, quien logro en 1995 establecerlo como variedad tolerante a enfermedades y de alta productividad, razones por las que fue declarado por el Ministerio el 22 de Junio del 2005, como cacao de origen ecuatoriano apto para producción y comercialización (Anecacao 2015).

El cacao CCN-51 es un árbol pequeño lo que facilita su manejo en campo., inicia su producción a los dos años con duración de 40 años, posee una productividad entre 2-205 Ton/Ha, tolerante a enfermedad como Escoba de bruja (*Moniliophthora perniciosa*), sus frutos son grandes con semillas grandes de 1.4 a 1.5 gr (Anecacao 2015).

Pos cosecha

Factores que influyen en la calidad de la materia prima

Existen tres factores que determinan la calidad del grano en el campo; la genética del grano, las condiciones ambientales y la manipulación de las semillas y mazorcas. Ciertas prácticas de cosecha pueden mejorar la calidad de la materia prima, entre ellas tenemos la correcta recolección y selección de mazorcas maduras, debido a que mazorcas pintonas pueden no contener suficientes azúcares y humedad en su pulpa, o frutos sobre maduros que pueden presentar semillas germinadas; condiciones que limitan el proceso de fermentación (Enríquez 2010).

El tiempo entre la cosecha y la apertura de mazorcas, es otro factor que influye sobre la calidad de la materia; al almacenar mazorcas maduras en un periodo de tres días, estas tienden a perder agua, lo que agiliza el inicio de la fermentación y permite el control de la temperatura, mejorando la acidez de las almendras, sin embargo, se recomienda no mezclar almendras extraídas en diferentes días (Coexca 2017).

Entre otros factores a considerar, tenemos la apertura de mazorcas, en la cual se debe evitar dañar las semillas con cortes o aplastamientos, estas deben estar libres de trozos de cáscaras o placenta, pues estos residuos afectan el proceso de fermentación (Enríquez 2010).

La remoción de la masa durante la fermentación del cacao juega un papel importante, pues permite la regulación de la temperatura y la eliminación de CO₂, e impide la aglomeración de los granos y el consecuente desarrollo de hongos en la superficie y en las esquinas de los fermentadores (Coexca 2017). El tiempo de fermentación varía de acuerdo a la variedad que se esté fermentando.

Fermentación

La fermentación de cacao es un proceso que consiste en almacenar granos frescos principalmente en cajones o sacos de yute por un periodo de cuatro a siete días, en el cual se elimina el mucílago por acción microbiana, el aire y las altas temperaturas; condiciones que provocan la formación de péptidos, aminoácidos y azúcares reductores que se transforman por reacciones de Maillard y de degradación de Strecker en el interior de la almendra, generando cambios físicos-químicos, como: cambios de pigmentación y textura, pérdida de acidez y sabor astringente, entre otros ; aspectos que determinan el sabor y aroma característico del chocolate (Sevilla 2007; Salous 2019).

El proceso de fermentación se lleva a cabo a un pH entre 3.3 a 4.0 debido a la presencia de ácido cítrico, y alcanza temperaturas sobre los 50 °C. Factores como la humedad y temperatura ambiental pueden retrasar el tiempo de fermentación (Salous et al. 2019).

Para el caso del cacao CCN-51, se requiere realizar un escurrimiento inicial con la finalidad de disminuir la cantidad de pulpa, lo que contribuye a mejorar la acidez final y su tiempo de fermentación (Coexca 2017).

El proceso consta de tres fases:

Etapas de hidrólisis o fase alcohólica. Se caracteriza por la actividad de levaduras anaeróbicas, que despolimerizan la pectina de la pulpa que recubre a la almendra, ocasionando la ruptura de las células y el desprendimiento de líquidos durante las primeras 48 horas, los azúcares del mucílago son transformados principalmente en etanol (Coexca 2017; Salous 2019; De Vuyst & Leroy, 2020).

Durante el proceso la masa fermentada libera agua, CO₂ y se genera un aumento de temperatura que alcanza los 45 °C, con un pH menor a 4.5, lo que favorece la prevalencia de las levaduras durante la fermentación (Coexca 2017). El elevado consumo de oxígeno por parte de las levaduras, crea un ambiente óptimo para el desarrollo de bacterias ácido lácticas, las cuales transforman la glucosa y fructosa a manitol y, el ácido cítrico presente en la pulpa a ácido succínico y ácido pirúvico, que luego pasa a ser ácido láctico y en menores cantidades a etanol, ácido acético, acetaldehído, diacetilo, acetoína y 2,3- butanodiol. Estas reacciones provocan un incremento de temperatura hasta los 50 °C, manteniéndose durante las primeras 36 a 48 horas (Ho et al. 2015; Salous 2019; Sarbu y Csutak 2019).

Etapas de fermentación acética. La segunda fase se caracteriza por la inhibición de la actividad de las levaduras, debido a la disminución del contenido de oxígeno, el incremento del contenido de alcohol y de pH.

A medida que se forma etanol por acción de las levaduras y bacterias ácido lácticas, este es convertido en condiciones aeróbicas por bacterias acéticas en acetaldehído, que luego es reducido por un aldehído deshidrogenasa en ácido acético, y por la coenzima acetil-CoA a dióxido de carbono y agua (Sarbu y Csutak 2019). El ácido acético atraviesa el tegumento y los cotiledones de la semilla, provocando la muerte del embrión (Coexca 2017; Salous 2019). El proceso se da entre las 48 y 96 horas siguientes, alcanzando temperaturas entre los 48 a 51 °C, y un pH entre 4 a 5 (Santander et al. 2020; Sevilla 2007).

Las alteraciones químicas que definen las características del grano fermentado, se dan a causa de la muerte del embrión y las células del cotiledón, lo que aumenta la permeabilidad y permite el ingreso de los polifenoles a las células adyacentes y la liberación de enzimas endógenas que catalizan los péptidos y aminoácidos a partir de proteínas de almacenamiento de semillas; lo que da inicio al agrietamiento y cambio de color de los granos (Santander et al. 2020; Sevilla 2007).

Etapas de oxidación. Durante esta etapa se da un incremento del contenido de oxígeno, sin embargo, existe una disminución del nivel de humedad de la masa fermentada, que anula la actividad enzimática y limita el proceso de fermentación acética por falta de etanol (Sevilla 2007).

En el interior del grano se da la degradación de los polifenoles, antocianinas y alcaloides, dando paso a la síntesis de quinonas que forman la coloración marrón final de la almendra. El

proceso inicia a las 96 horas siguientes de la fermentación, por lo que se realiza remociones de la masa, con la finalidad de volatilizar parte del ácido acético, liberar CO₂ acumulado, he incrementar el ingreso de aire fresco (Coexca 2017).

Secado

El cacao crudo contiene una humedad del 60%, sin embargo, esta se reduce al 7%, a través del proceso de secado, el que consiste en extender los granos sobre el suelo exponiéndose al sol, o a calor artificial que no exceda una temperatura de 65 °C, con un tiempo aproximado de una semana (De la Cruz et al 2009; Sevilla, 2007).

Métodos de fermentación

Como un factor determinante tenemos el método de fermentación a emplear, siendo la caja de madera la más utilizada, debido a que este tipo de diseño influye de manera positiva sobre las características físicas y químicas de las almendras (Coexca 2017).

Habitualmente se maneja cajas de manera blancas libres de taninos o resinas, de dimensiones de 80 a 120 cm de ancho y una altura de 90 cm, el largo varía de acuerdo a la capacidad de producción, deben estar perforadas en la base con hoyos de diámetro de 7 mm a 8 mm, que permitan escurrir los residuos de la fermentación (Enríquez 2010).

Otro método tradicional, es el uso de sacos de yute o plástico, en los que se deja fermentar a las almendras por un periodo de 2 a 5 días. Para este proceso es necesario cambiar de recipiente o saco cada día, conjuntamente con la remoción de la masa, con el propósito de mejorar la mezcla de las almendras y su aireación. Los sacos deben procurar mantener la temperatura al menos los 3 primeros días, por lo que se recomienda ser apilados y guardados en lugares cerrados (Enríquez 2010).

Diversidad microbiológica y bioquímica del cacao.

Generación de los precursores del sabor.

Entre los principales compuestos que se forman durante la fermentación de cacao está el etanol, precursor del ácido acético, sintetizado principalmente por bacterias ácido acéticas y, el manitol producido por bacterias ácido lácticas, dichos compuestos ingresan y modifican la estructura del grano mediante reacciones enzimáticas, en las que participan enzimas endógenas, como la invertasa, glucosidasas, proteasas y polifenoloxidasas dando paso a cambios bioquímicos internos del grano

El objetivo principal del proceso de fermentación, es que a partir de componentes específicos del grano: proteínas y carbohidratos, se dé la formación de los precursores del sabor y aroma característicos del chocolate, que son azúcares reductores, péptidos y aminoácidos, los cuales son transformados finalmente a través de las reacciones de Maillard durante el proceso tostado (; Santander et al. 2020).

Existen tres componentes del grano que forman los precursores del sabor:

Proteínas. El grano de cacao está constituido del 10 al 15 % de proteína, siendo el 52% y 43 % de albúmina y Vicilina, respectivamente, dichas proteínas se hidrolizan por la acción conjunta de las enzimas: endoproteasa aspártica y carboxipeptidasas propias de las semillas de cacao; esta reacción está mediada por las condiciones fisicoquímicas del proceso: temperatura y pH (Santander et al. 2020).

Las diferencias de sabor entre variedades se deben al grado de proteólisis alcanzado durante la fermentación y a su composición proteica. Durante este proceso se libera oligopéptidos y aminoácidos (Santander et al. 2020).

Carbohidratos. La sacarosa constituye del 2.1 a 3.2 % de los azúcares disponibles de la pulpa del grano de cacao. Este compuesto es hidrolizado por la enzima invertasa, dando como resultado azúcares reductores: glucosa (2.4–4.1%) y fructosa (4.2– 6.2%) (Jespersen et al. 2005). Azúcares que intervienen en las reacciones de ennegrecimiento de Maillard no enzimáticas, así como otros azúcares reductores libres en el grano: manitol, inositol, xylosa y sorbosa, que permiten la formación química de un compuesto saborizante específico del chocolate llamado alquil pirazina (Santander et al. 2020).

Los compuestos dicarboxílicos resultado de la reducción de los azúcares interactúan con aminoácidos libres, en este caso, metionina a través de la degradación de Strecker, lo que conduce a la formación de un compuesto orgánico volátil, el methional, el cual se descompone para generar metanotiol que se oxida a dimetil disulfuro, fuente de compuestos de azufre que contribuyen al desarrollo del sabor del chocolate; otros compuestos pequeños sufren reacciones de condensación y generan 2,5 dimetil-3-etil-pirazina, que se asocia con el sabor tostado (Santander et al. 2020).

Polifenoles. Otro componente que contribuye a definir el sabor son los polifenoles, responsables también de la formación del color marrón de los granos de cacao. Las células polifenólicas, también conocidas como células pigmentarias, representan del 11% al 13% de todo el tejido. Hay tres grupos fenólicos encontrados en el cacao: catequinas (alrededor del 37%), antocianinas (alrededor del 4%) y leucoantocianinas (alrededor del 58%) (Predan et al. 2019; Santander et al. 2020).

Las catequinas se oxidan a quinonas a través de reacciones enzimáticas catalizadas por la polifenol oxidasa. Las quinonas pueden reaccionar de manera irreversible y polimerizarse con

compuestos como aminoácidos, especies fenólicas, péptidos y proteínas para formar taninos de alta masa molecular que se almacenan en las células pigmentarias de los cotiledones, denominados pigmentos (Santander et al. 2020).

Las antocianinas como 3-b-D galactosidilo y 3-a-arabinosil cianidinas, son hidrolizadas rápidamente por enzimas glucosidasas, generando antocianinas y azúcares como galactosa y arabinosa (Vázquez et al. 2016; Santander et al. 2020). Esta hidrólisis provoca cambios en la coloración y se genera del color marrón típico del cacao bien fermentado. Por tal razón el contenido de antocianinas es considerado como un marcador para evaluar el grado de fermentación, como se lo realiza en la prueba de corte de granos, basada en los cambios de color de los cotiledones.

Las proantocianidinas, otros polifenoles conocidos como taninos densos, a altas temperaturas y bajo condiciones ácidas se hidrolizan a antocianinas (encianidina y epicatequina). Los alcaloides, en particular las metilxantinas, cafeína y la teobromina, así como los compuestos polifenólicos en particular las proantocianidinas y flavan-3-ols (epicatequina y catequina), dan origen al sabor amargo y astringente de la almendra (Vázquez et al. 2016).

Otros metabolitos microbianos, como ésteres y pirazinas, pueden ingresar a los cotiledones de la almendra y actuar como precursores o directamente como compuestos del sabor (De Vuyst & Leroy, 2020).

Microorganismos y factores circundantes

Durante el proceso de fermentación, el papel de los microorganismos se limita a la eliminación de la pulpa y la producción de metabolitos indispensables, precursores del aroma y sabor, esto a su vez implica el crecimiento de diversas especies de levaduras, bacterias ácido lácticas y acéticas y algunas especies de hongos filamentosos y Bacillus (Ho et al. 2015).

Entre los principales microorganismos que participan durante este proceso tenemos:

Levaduras. Encargadas de la despolimerización de la pectina, que da inicio a la fermentación anaeróbica de los azúcares de la pulpa a etanol (Vázquez et al. 2016; Salous 2019). Durante la primera fase se ha identificado entre 5 a 6 levaduras, predominando entre las primeras 24 horas la especie *Hanseniaspora guilliermondii* (Ho et al. 2015; Salous 2019). Seguido de *Candida krusei* y *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida zemplinina*, *Candida silvae* y *Candida diversa*. A las 36 a 38 horas se reportan especies como *Saccaromyces cerevisiae*, *Pichia membranaefaciens* y *Pichia kluyveri*, (Salous 2019; Sarbu y Csutak 2019).

Bacterias ácido lácticas. Encargadas de la fermentación microaerofílica de azúcar y ácido cítrico a ácido láctico y manitol, además de regular el pH del grano permitiendo la acción de las enzimas endógenas (Vázquez et al. 2016; Salous 2019). Se ha identificado especies como *Lactobacillus collonides*, *Lb fermentum*, *Lb mali* y *Lb plantarum*, sin embargo, también se ha encontrado bacterias del género *Leuconostoc* y *Pediococcus* (Ho et al. 2015; Salous 2019).

Bacterias ácido acéticas. Encargadas de la fermentación aeróbica del etanol en ácido acético (Vázquez et al. 2016; Salous 2019) Las bacterias con mayor presencia son *Gluconobacter oxydans*, *Acetobacter aceti*, *Acetobacter ghanensis* y *Acetobacter pasteurianus* (Ho et al. 2015; Salous 2019; Sarbu y Csutak 2019).

Capítulo III

Materiales y Métodos

Área de muestreo

La toma de muestras se realizó en la empresa República del cacao en colaboración con COFINA, dedicada a la producción sostenible del Cacao Fino de aroma y CCN- 51 con productores locales. Está ubicada en la parroquia Antonio Sotomayor perteneciente al cantón Vinces, provincia de Los Ríos, a 17 msnm (Latitud: 1°36'00" S; Longitud: 79°42'29" O).

El cantón Vinces posee un clima húmedo – tropical, con una pluviosidad anual de 1000 a 2000 mm en época lluviosa, temperatura que oscila desde los 24 a 30 °C en época seca y una humedad relativa del 98 %; cuenta con 4 tipos de ecosistemas: Bosques semideciduo, Bosque siempre verde estacional inundable, Herbazal inundable ripario de tierras bajas del Chocó Ecuatorial y Herbazal inundable de Jama- Zapotillo (Dutan et al. 2015).

Monitoreo y muestreo de almendra de cacao fermentado

Las almendras de cacao de la variedad Trinitario clon CCN-51, se cosecharon de plantaciones cacaoteras en la localidad de Vinces, provincia de Los Ríos - Ecuador, durante un ciclo de producción en el mes de agosto 2020 y fueron fermentadas por métodos tradicionales que maneja la Estación de producción COFINA. Las operaciones de fermentación para la variedad Trinitario clon CCN-51, se llevaron a cabo en costales de yute, y se monitorearon cada 24 horas desde el establecimiento del ensayo, durante un periodo de 4 días (96 horas), en los cuales se recolectaron dos muestras de aproximadamente 100 gr de la biomasa de cacao. Cada muestra fue transferida a fundas de plástico estériles, codificadas y almacenadas a – 20°C, para los posteriores análisis físico-químicos y microbiológicos y a -80 °C para análisis bioquímicos.

Inoculación de levaduras y bacterias

Se realizó un cultivo iniciador microbiano de levaduras y bacterias aisladas e identificadas morfológica y molecularmente, en la fase de fermentación en cacao Nacional y Trinitario CCN-51; datos tomados como referencia de la investigación realizada por Muñoz y Gómez (2020) en la Universidad de las Américas en asociación con Republica del cacao y COFINA.

Se trabajó con *Torulaspota dulbruecki*, *Hanseniaspora uvarum* (levaduras), *Lactobacillu plantarum* (Bacteria ácido láctica) y *Acetobacter ghanensis* (Bacteria ácido acética), las cuales fueron multiplicadas en medios líquidos esterilizados: NYDB (8 g de Caldo nutritivo, 5 g de extracto de malta, 10 g de Dextrosa + 1 l de agua destilada), MRS (Man Rogosa Agars y YGC (Glucose Yeast Extract), respectivamente. Los cultivos se incubaron durante 72 horas en un agitar orbital a una temperatura de 25 °C, con concentraciones finales de 1×10^8 UFC/ml.

Análisis físico-químicos

Los parámetros físicos del ambiente y las temperaturas de fermentación de la masa de cacao en campo, se monitorearon cada 24 horas usando un medidor de pH de campo Hanna instruments HI98128 y un datalogger para la temperatura y humedad Testo 175 H1 (MN Technologies).

Los parámetros químicos de pH y contenido de agua se midieron acorde a las metodologías descritas por López y Passo (1985) y Gálvez et al. (2007). Para la determinación del pH se prepararon muestras de 20 g de almendras de cacao inmersas en 100 ml de agua Ultrapura, la medida se tomó del sobrenadante de la muestra. La humedad de la almendra se determinó en base a las normas internacionales ISO 2291-1972, para lo cual se secó las muestras de cacao a 103 °C por 16 horas, en los diferentes tiempos de fermentación.

Análisis bioquímicos

Las muestras de 100 g de granos de cacao en baba de la variedad CCN-51 almacenadas a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$, se liofilizaron y homogenizaron. La concentración de ácidos orgánicos y azúcares, se analizaron por cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC) en el Sistema Agilent Technology 1260, Waldbronn, Alemania; en base a lo descrito por Ho et al. (2015) y Nour et al. (2010), para lo cual se modificó la longitud de onda a 210 nm, el caudal de inyección a 10 μl y la temperatura isocrática a $10\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Cuantificación de Ácidos orgánicos (Ácido láctico, oxálico, cítrico, málico, acético)

Los extractos de ácidos orgánicos se prepararon con 5 gramos de cada muestra de cacao liofilizado, disueltos en 60 ml de agua Ultrapura y removidos por 10 minutos. Se centrifugó la mezcla homogénea a 5000 rpm por 30 min a $5\text{ }^{\circ}\text{C}$, el sedimento se lavó dos veces con 20 ml de agua Ultrapura. Los sobrenadantes se centrifugaron de nuevo por 15 minutos y filtraron mediante una membrana Millex Millipore de $0.45\text{ }\mu\text{m}$.

Los extractos de ácidos orgánicos se removieron con el equipo de HPLC Eclipse Plus C18 $250 \times 4.6\text{ mm } 5\text{ }\mu\text{m}$ con una fase móvil de $50\text{ mM } \text{KH}_2\text{PO}_4$ (Fosfato monopotásico) ($\text{pH}=2.8$ con ácido fosfórico) a un caudal de 0.7 ml min^{-1} , con volumen de inyección de $10\text{ }\mu\text{l}$ a $20\text{ }^{\circ}\text{C}$ y detectado por el equipo 1260 Infinity II Multiple Wavelength Detector (Detector de diodo array Agilent 1260 II - G7117C) a 210 nm de longitud de onda.

La concentración de ácidos orgánicos se determinó por comparación con curvas estándares, construidas a partir de soluciones madre de ácidos comerciales (Tabla 2). Los datos recolectados se analizaron con el software del equipo de HPLC. Los análisis se repitieron dos veces. Los resultados se expresaron en miligramos por gramo de materia seca de cacao (mg g^{-1} DM).

Tabla 2*Preparación de curvas de calibración*

Tipo de ácido comercial	Solución madre (mg/ml)	Rango de curva de calibración
Ácido oxálico (Pureza 99.5%)	0.1 mg/ml	75-5 ppm
Ácido málico (Pureza 100 %)	0.01 mg/ml	500-10 ppm
Ácido láctico (Pureza 90%)	0.3 mg/ml	100-5 ppm
Ácido cítrico (Pureza 99.5%)	0.2 mg/ml	100-5 ppm
Ácido acético (Pureza 100 %)	0.28 mg/ml	100-5 ppm

Cuantificación de azúcares (glucosa, sacarosa y fructosa)

Las concentraciones de azúcares (sacarosa, fructosa y glucosa) se determinaron mediante HPLC siguiendo la metodología descrita por Dai, et al. 2010.

Los extractos de azúcares se prepararon con 500 mg de cada muestra, disueltos en 50 ml de agua Ultrapura y se removieron por ultrasonido durante 20 minutos. De la solución se tomó mililitros (pH=13.5 con 0.3 M NaOH), que se mezclaron con 100 µl de una solución de poli metil piruvato a 0.5 M. Las muestras se incubaron a baño María por 2 horas a 70 °C y se ajustó el pH con una solución de HCl a 0.3, se añadió 1 ml de cloroformo grado HPLC y se centrifugaron (Eppendorf Centrifuge 5424R) a 10000 rpm durante 5 minutos. Finalmente, de cada una de las muestras se extrajo el sobrenadante, se filtró a través de un filtro de 0.45 µm; los residuos acuosos se eluyeron en el equipo de HPLC Eclipse Plus C18 250 x 4.6 mm, 5 µm, como se describió anteriormente con una fase móvil de buffer de fosfato a 0.1 M y acetonitrilo en un radio de 83:17 (v/v,%) a un caudal de $1\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$, 20 µl de volumen de inyección, 35 °C y detectaron por el equipo UV/VIS Detector a una longitud de onda de 245 nm.

La concentración de azúcares se determinó por comparación con curvas referenciales construidas a partir de estándar comerciales (sacarosa, fructosa y glucosa), para lo cual se

disolvió 10 mg de cada estándar en 10 ml de agua Ultrapura, posteriormente se tomaron alícuotas de la solución madre en un rango de 0,005 mg/ml a 0,070 mg/ml (5ppm a 70ppm). Los datos recolectados se analizaron por el software del equipo de HPLC y, se repitieron dos veces.

Cuantificación del Contenido total de polifenoles

El contenido total de polifenoles (TPC) de la variedad Trinitario CCN-51 durante la fermentación, se determinó por espectrofotometría de masas, con la metodología de Carrillo et al., (2014), para lo cual se modificó los volúmenes a usar de los reactivos y la dilución.

Se prepararon extractos con 2 g de cada muestra de cacao liofilizado disueltos en 40 ml de metanol al 80%. Las muestras se agitaron durante 1 hora en planchas de calentamiento. Posteriormente, se filtraron para obtener extractos sin residuos sólidos. Se realizó diluciones con los extractos 1:9 ml con agua Mili-Q para bajar la concentración, de tal manera que la muestra pueda ser ionizadas en su totalidad por el equipo y no se obtenga una elevada concentración de iones que puedan dar lugar a reacciones biomoleculares y por ende resultados erróneos.

Se tomaron 100 μ l de cada dilución, y se añadió 500 μ l del reactivo Folin Ciocalteu's, (Sigma-Aldrich), las muestras se incubaron a temperatura ambiente (20°C) durante 5 minutos y posteriormente se añadió 400 μ l de solución de Carbonato de sodio. Finalmente, las muestras se almacenaron en la oscuridad a temperatura ambiente durante 2 horas. La absorbancia se midió después de 1 hora a una longitud de onda de 760 nm en el espectrofotómetro Shimadzu/ UV MINI-1240. Basado en una curva de calibración de ácido gálico como referencia, el TPC se expresó en miligramos de ácido gálico por gramo de materia seca de cacao ($\text{mg GAE} \cdot \text{g}^{-1} \text{ DM}$). Los análisis se repitieron dos veces.

Análisis microbiológicos. Cuantificación de la dinámica poblacional

La dinámica poblacional de microorganismos presentes en almendras de la variedad CCN-51 durante la fermentación, se determinó con 15 g de almendras de la muestra inicial disueltas en 145 ml de PB en bolsas de plástico estéril. Cada muestra se homogenizó en el mezclador Stomacher durante 5 minutos a alta velocidad (Bagmixer 100 Minimix, Interscience). Se realizaron diluciones en serie de las mezclas homogenizadas, que se esparcieron en platos por duplicado con diferentes medios de cultivo solidificados. Todos los platos se incubaron a temperatura ambiente de 1- 4 días. Las placas de agar de levaduras, hongos filamentosos, bacterias ácido acéticas y la flora aeróbica mesofílica se incubaron bajo condiciones aeróbicas, a diferencia de las bacterias ácido lácticas que se incubaron en candle-jars bajo condiciones anaeróbicas

Posterior a la incubación, se realizó un conteo de colonias. La cuantificación microbiana para hongos filamentosos y levaduras, se realizó en agar extracto de malta (MEA plus 100 mg.l^{-1} de oxitetraciclina, Oxoid) y agar rosa de Bengala con cloranfenicol (RBC.Oxoid); para bacterias ácido lácticas en agar Man, Rogosa y Sharpe (MRS plus 100 mg.l^{-1} , Oxoid); y para bacterias ácido acéticas en Agar Extracto de levadura y glucosa (GYEA; 50 g.l^{-1} glucosa, 5 g.l^{-1} de extracto de levadura, 15 gr.l^{-1} agar plus 100 mg.l^{-1} cicloheximida); y Agar Nutritivo-Dextrosa para Levaduras (NYDA: 8 g.l^{-1} Caldo nutritivo, 5 g.l^{-1} de extracto de levadura, 10 gr.l^{-1} dextrosa y 20 gr.l^{-1} de agar) para flora aeróbica mesofílica.. Los análisis de cuantificación microbiana se repetidos dos veces.

Prueba de corte

Se tomaron 100 almendras de las muestras pre-inoculadas y sin inocular del cuarto día de fermentación. Las cuales se cortaron por la mitad y se evaluó rápidamente la coloración

interna de la almendra, para evitar procesos oxidativos. Se cuantificó los granos bien fermentados, parcialmente fermentados, pizarrosos, mohosos, sobrefermentados y sin fermentar según la norma INEN, (2018) y (Coexca, 2017).

Diseño experimental

Se evaluaron dos factores: (i) Tipo de inoculación (inoculado y no inoculado) y (ii) Tiempo de fermentación de la variedad de cacao trinitario clon CCN-51 (0, 24, 48, 72, 96 horas). La unidad experimental fue un saco de yute con 60 kg de almendra de cacao y se utilizó 4 sacos. El experimento se dispuso bajo un diseño completamente al azar (DCA), en parcela dividida (2x5) con 2 repeticiones, cuyo modelo matemático es el siguiente:

$$Y_{ijk} = \mu + P_i + \delta_{k(i)} + T_j + (P * T)_{ij} + e_{ijk}$$

Donde:

Y_{ijk} = Contenido total de Polifenoles, azúcares y ácidos orgánicos.

μ = Media general

P_i = Efecto del i-ésimo Tipo de inoculación.

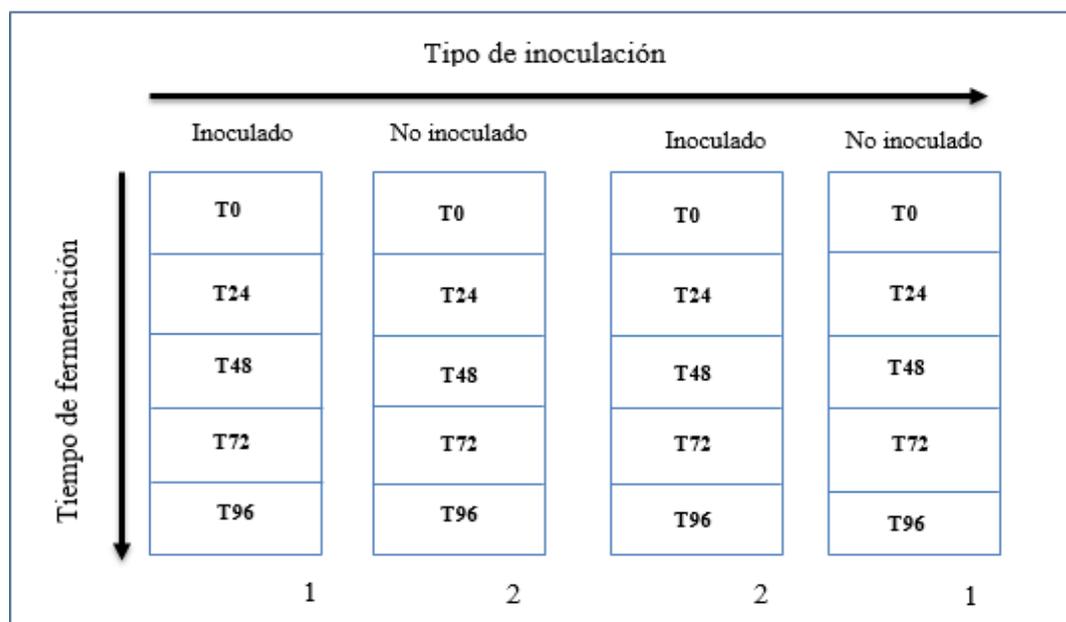
$\delta_{k(i)}$ = Error para el Pre-inóculo de bacterias y levaduras

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

$(P * T)_{ij}$ = Efecto de la interacción de Pre-inóculo de bacterias y levaduras.

e_{ijk} = Error para el día de fermentación.

La disposición del experimento en el campo se muestra en la Figura 1.

Figura 1*Croquis experimental***Análisis de la información**

Las variables de temperatura y pH de la masa fermentada, dinámica poblacional y contenido total de polifenoles, azúcares y ácidos orgánicos se caracterizaron mediante estadística descriptiva (media y desviación estándar). Para comparar las variables entre tratamientos, se realizó un Análisis de Varianza (ANAVA), y pruebas de comparación de medias mediante la prueba LSD Fisher al 5%, para tratamientos, tiempos e interacciones. Todos los análisis se realizaron utilizando el software de INFOSTAT (Di Rienzo et al. 2018).

Capítulo IV

Resultados y Discusión

Parámetros físicos- químicos

Durante la fermentación en presencia o ausencia del cultivo iniciador se observó una similar tendencia en el incremento del pH en las masas de cacao; en el caso de las muestras control, el pH a las 96 horas de fermentación fue ligeramente inferior a lo descrito por Jespersen et al. (2005) y Gálvez et al. (2007). Sin embargo, en las muestras pre-inoculadas se observó un pH similar al informado por Craack et al. (2013) y Visintin et al. (2017), quienes emplearon cepas de levaduras de *Saccharomyces cerevisiae*, *Torulaspota delbruecki*, *Pichia kluyveri* y *Kluyveromyces marxianus*, como cultivos iniciadores. El aumento del pH se correlacionó con un incremento de la concentración de ácidos acético y láctico en el medio, sintetizados a partir de ácido cítrico y etanol por bacterias ácido lácticas y acéticas (De Vuyst y Leroy 2020).

Tabla 3

Promedio ± desviación estándar del pH y temperatura, en almendras de cacao CCN 51, pre-inoculadas con un cultivo iniciador bacteriano, durante 96 horas de fermentación

Tratamientos	Tiempo de fermentación				
	0	24	48	72	96
Pre-inoculado					
pH	3,95 ± 0,05 ^e	4,16 ± 0,01 ^d	4,24 ± 0,04 ^c	4,24 ± 0,01 ^c	4,37 ± 0,01 ^a
Temp. (°C)	24,443 ± 0,64 ^g	25,40 ± 0,71 ^{fg}	29,33 ± 0,78 ^e	35,75 ± 0,78 ^d	46,10 ± 0,42 ^a
Control					
pH	3,98 ± 0,02 ^e	4,31 ± 0,01 ^b	4,40 ± 0,01 ^a	4,31 ± 0,01 ^b	4,35 ± 0,06 ^a
Temp. (°C)	25,50 ± 0,42 ^{fg}	25,00 ± 0,42 ^{fg}	26,00 ± 0,57 ^f	40,45 ± 0,35 ^c	41,85 ± 0,49 ^b

Nota. Medias con una letra en común horizontal no son significativamente diferentes (LSD Fisher, $p > 0,05$).

El pH es considerado un factor limitante ya que regula las actividades biocatalizadoras de enzimas. Santander et al. (2019) y Castro et al. (2019) menciona que a un pH de 4.5-5.5 existe una activación eficiente de las enzimas endoproteasa aspártica y carboxipeptidasa, logrando una degradación controlada de proteínas y una mayor liberación de aminoácidos hidrófobos tales como leucina, alanina, tirosina y fenilalanina, los cuales forman parte de los precursores del sabor de cacao. Conjuntamente se observó un incremento constante de la temperatura con una máxima a las 96 horas de fermentación en las muestras pre-inoculadas con respecto a las muestras control, con un promedio de 46,20 °C (Tabla 3), valor superior al observado por Crafacck et al. (2013), Sandhya et al. (2015) y Visintin y et al. (2017). Esto puede atribuirse a una aceleración de las reacciones exotérmicas causadas por una mayor cantidad y actividad microbiana de la masa inoculada (Gálvez et al. 2007; Visintin et al. 2017).

Cuantificación de la dinámica poblacional

Durante el proceso de fermentación de la variedad de cacao CCN-51, las poblaciones de hongos filamentosos presentaron un efecto significativo independiente para los factores; tiempo de fermentación ($F=4,09$; $p=0,0428$) y pre-inóculo ($F=21,16$; $p=0,0441$).

El menor crecimiento poblacional de hongos filamentosos se observó en las muestras pre-inoculas, alcanzando una población de 5.37 log UFC/ml (3.39×10^5 UFC/ml). Según Ardhana y Fleet (2003) y Copetti et al. (2014), el crecimiento fúngico puede estar limitado por factores como pH, la acción de ácidos orgánicos, humedad y temperaturas elevadas que se alcanza durante el proceso.

En cuando al tiempo de fermentación, el mayor recuento de hongos se observó a las 24 y 96 horas, con valores de 5,80 y 5,82 log UFC/ml (1.06×10^6 y 1.13×10^6 UFC/ml) respectivamente, similares a los obtenidos por Ardhana y Fleet (2003). La prevalencia de

especies tales como *Penicillium citrinum*, *Aspergillus versicolor*, *Aspergillus wentuu*, *Penicillium purpurogenum*, *Penicillium sclerotiorum*, *Penicillium paneum*, *Penicillium crustosum*, se debe a su capacidad para tolerar los cambios de temperatura y su potencial para desarrollarse en las testas de las almendras; así el mayor crecimiento de hongos filamentosos se evidencia en los últimos días de fermentación o cuando la masa de cacao no se ha volteado con regularidad (Copetti *et al.* 2014 ; Schwan *et al.* 2016). La presencia de hongos filamentosos no es deseable debido a que producen micotoxinas como la acrotoxina A y aflatoxina, perjudiciales para salud humana y para la calidad del chocolate (De Vuyst y Leroy 2020; Viesser *et al.* 2020).

La población de levaduras presentó diferencias significativas para la interacción pre-inóculo * el tiempo de fermentación ($F=4,42$; $p=0,0354$). Al inicio del proceso las muestras control presentaron un recuento ligeramente inferior respecto a las muestras pre inoculadas con un promedio de 6.85 Log UFC/ml (7.05×10^6 UFC/ml), valores similares a los informados por Gálvez *et al.* (2007); Camu *et al.* (2008) y Craffack *et al.* (2013). Las masas de cacao pueden presentar un alto recuento inicial de poblaciones microbianas debido a las condiciones de manejo de las almendras; considerando que por daños en las mazorca, inoculación espontánea por insectos, lugar de muestreo, entre otras razones, se incrementa la fauna microbiana lo que puede acelerar la descomposición de azúcares de la pulpa (Jespersen *et al.* 2005; Craffack *et al.* 2013; De Vuyst y Leroy 2020).

Las levaduras se mantuvieron durante todo el proceso de fermentación, sin embargo, a las 72 horas se observó una disminución de la población en las muestras control, con un promedio de $1,84 \times 10^5$ UFC/ml, siendo el valor más bajo respecto al resto de tratamientos (Figura 2). Esta disminución se puede atribuir al incremento de la temperatura, pH y quizá al agotamiento de los azúcares disponibles, causado por la síntesis de etanol y ácido láctico

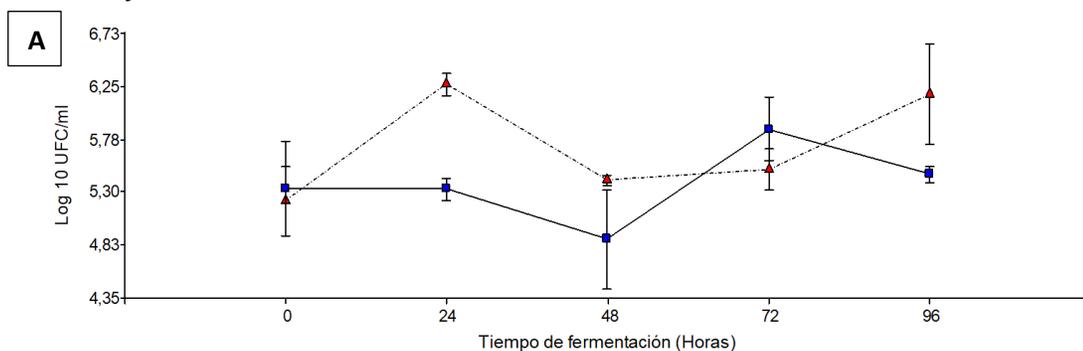
(Crafack et al. 2013 ; De Vuyst y Weckx 2015). Cabe mencionar que las levaduras durante las primeras horas de fermentación también pueden producir glicerol que contribuye al sabor dulce de la almendra y ácido succínico que provee un toque de acidez a las mismas, entre otros compuestos aromatizantes como ésteres y aldehídos acelerando el consumo de azúcares (Castro et al. 2019 ; De Vuyst y Leroy 2020).

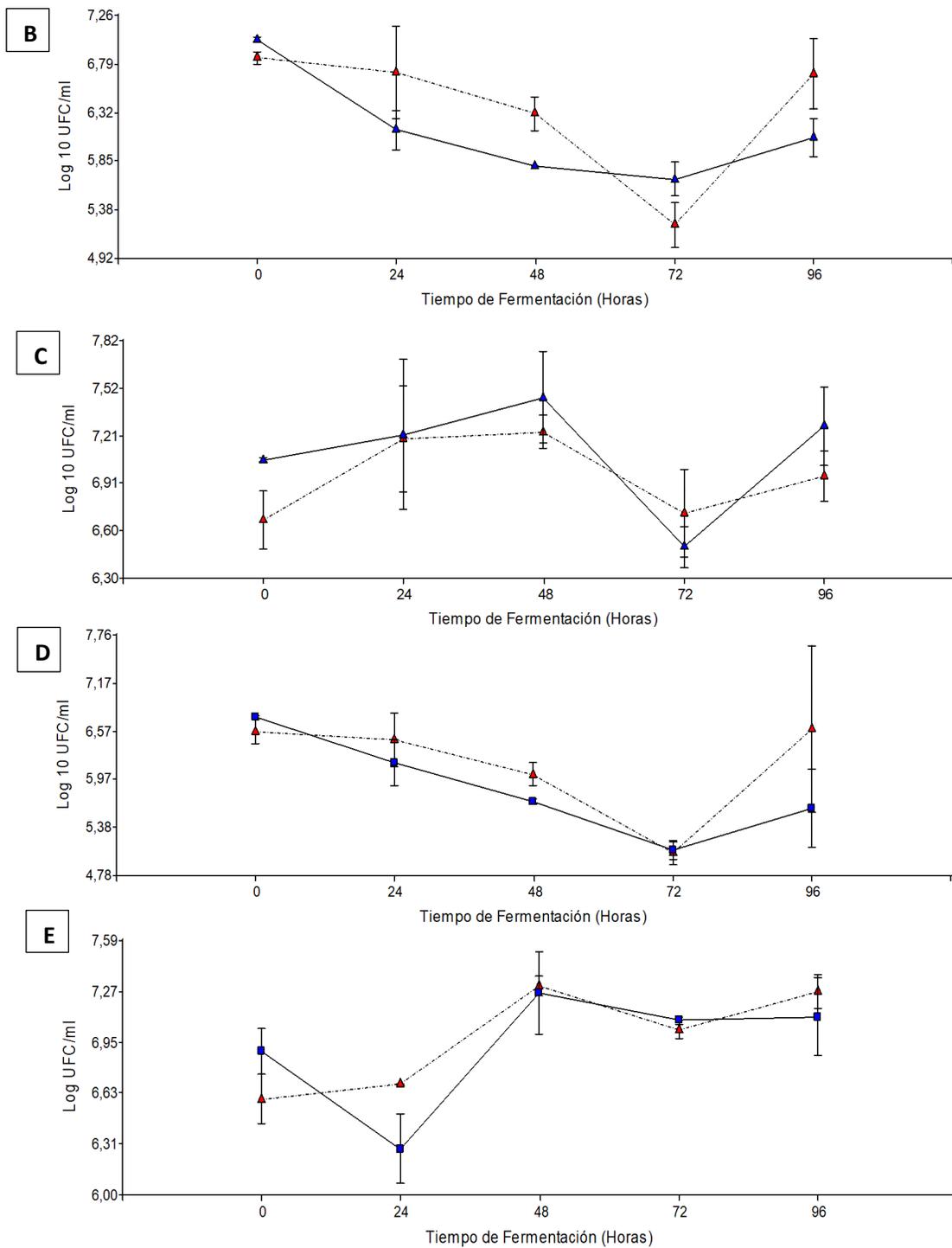
Al final de la fermentación se observó un ligero repunte de la población de levaduras, que puede ser causado por la presencia de ácido glucónico producto de la oxidación de la glucosa por bacterias *Gluconobacter spp*, las cuales se presentan durante el inicio de la fermentación y pueden ocasionar un mal sabor en el chocolate (De Vuyst y Weckx 2015; Papalexandratou et al. 2011).

Se encontraron diferencias significativas para el factor independiente tiempo de fermentación, en las poblaciones de bacterias ácido acéticas ($F= 0,0042$; $p= 9,34$), bacterias ácido lácticas ($F=5,46$; $p=0,0203$) y fauna mesófila ($F=14,80$; $p=0,0009$).

Figura 2

Cambios de crecimiento poblacional en almendras en ausencia y presencia del pre-inóculo durante 96 horas de fermentación





Nota. La línea puntea (\blacktriangle) representa la muestras control (sin inocular) y la línea continua (\blacksquare) las muestras pre-inoculadas para A. hongos filamentosos, B. Levaduras, C. Bacterias A. Lácticas, D. Bacterias A. Acéticas, E. Fauna Mesófila. Cada punto representa la media \pm desviación estándar de 2 repeticiones.

Los datos muestran un crecimiento paulatino de las bacterias ácido lácticas, hasta las 48 horas de fermentación con un valor de 7.35 log UFC/ml (2.49×10^7 UFC/ml), como lo menciona Galvez *et al.* (2007), Veiga Moreira *et al.* (2013) y Ho *et al.* (2015), quienes obtuvieron datos similares con poblaciones de $10^7 - 10^8$ UFC/ml, esto puede ser causado por un alto contenido de fructuosa y ácido cítrico disponible aún en la pulpa, que no ha sido consumido por levaduras (De Vuyst y Leroy 2020).

Agyrifo *et al.* (2019). menciona que el crecimiento de LAB puede estar favorecido por la liberación de algunos nutrientes provenientes de la lisis de levaduras y de CO_2 , subproducto de la fermentación inicial. Posterior a las 48 horas de fermentación se observó una disminución de LAB, esto se atribuye al incremento paulatino de oxígeno en la masa debido a la reducción de la pulpa, conjuntamente con el incremento de pH, temperatura y concentraciones de ácidos; condiciones que se vuelven óptimas para el desarrollo de AAB.

El mayor crecimiento poblacional de bacterias ácido-acéticas se observó al inicio de la fermentación con un promedio de 6.65 Log UFC/ml (4.61×10^6 UFC/ml), ligeramente menor a lo encontrado por Papalexandratou *et al.*, (2011). La poblacional de AAB disminuyó hasta las 72 h de fermentación con 5.08 log UFC/ml (1.24×10^5 log UFC/ml), diferente a lo informado por Gálvez *et al.* (2007) y Veiga Moreira *et al.* (2013) quienes mencionan que el crecimiento de AAB fue constante durante las primeras 36 horas, con poblaciones de 1.5×10^8 UFC/ml. Este decrecimiento de AAB se puede atribuir a la condición anaeróbica de la masa fermentante y al bajo contenido de etanol durante las primeras horas, lo que puede ser un indicativo de un retraso en el proceso de despolimerización de la pulpa, que limita el ingreso de oxígeno y por ende el crecimiento de AAB (Papalexandratou *et al.* 2011; De Vuyst y Weckx 2015; De Vuyst y

Leroy 2020). A las 96 horas se observó un repunte de la población de AAB, lo que coincide con el incremento de temperatura, pH, y la disminución de la concentración de levaduras y bacterias ácido lácticas; esto se relaciona con el cambio de fase aeróbica en la cual se dan las reacciones exotérmicas producto de la síntesis de ácido acético.

Para el caso de la fauna mesófila se observó un crecimiento a partir de las 24 horas de fermentación con $7.28 \log \text{ UFC/ml}$ ($1.99 \times 10^7 \text{ UFC/ml}$), similar a lo observado por Gálvez et al. (2007). El crecimiento de las bacterias mesófilas se debe principalmente al incremento del oxígeno; entre las especies más comunes tenemos las enterobacterias y bacilos que pueden desempeñar un papel en la despolimerización, sin embargo también pueden producir ácido glucónico causando sabores desagradables en las almendras al producir ácidos grasos de cadena corta y amoníaco, o pirazinas que son parte de los precursores de sabor de las almendras (Vuyst y Weckx 2015; Schwan et al. 2016 ; De Vuyst y Leroy 2020).

Cuantificación de azúcares (glucosa, sacarosa y fructosa)

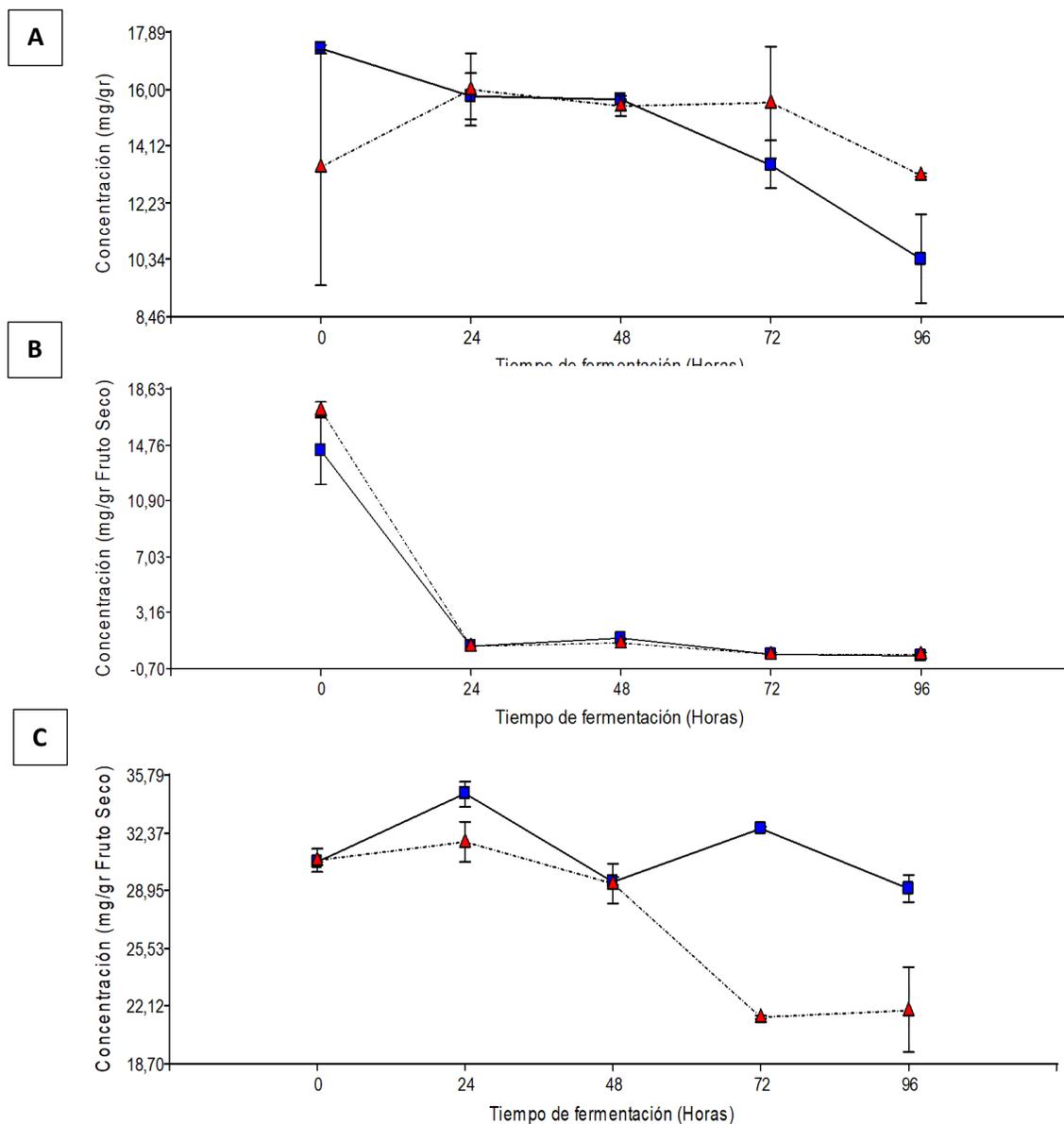
El contenido de Sacarosa mostró un efecto significativo para el factor independiente tiempo de fermentación ($F=4.3$; $p = 0.038$). La concentración inicial fue similar a lo informado por Hashim et al. (1998); Craack et al. (2013) y Veiga Moreira et al. (2013), esta disminuyó paulatinamente hasta las 96 horas de fermentación con un valor mínimo de $11,75 \text{ mg/g}$ de fruto seco, esto se debe a la hidrólisis de la sacarosa por acción de enzimas invertasas, en fructosa y glucosa, azúcares que son el sustrato en la síntesis de etanol, manitol y ácido láctico (Craack et al. 2013; De Vuyst y Weckx 2015 ; De Vuyst y Leroy 2020). El contenido inicial de azúcares reductores puede estar influenciado por prácticas de pre acondicionamiento de semillas al igual que por la variedad y las condiciones de cultivo antes mencionadas (Santander et al. 2019 ; De Vuyst y Leroy 2020).

El análisis de varianza para el contenido de fructosa y glucosa, mostró un efecto significativo para la interacción del pre-inoculo * tiempo de fermentación ($F= 18.56$, $p = 0,0004$; $H=18.34$, $p =0,0305$). Las muestras pre-inoculadas presentaron una mayor concentración de fructosa durante todo el proceso respecto a las muestras control, la cual fue mayor a las 24 horas de fermentación con $34,69 \text{ mg/ g}$ de fruto seco, datos superiores a lo informado por Crafacck et al. 2013 y Ramos et al. (2014). Esto puede ser el resultado de una aceleración de la hidrólisis de la sacarosa contenida en la pulpa durante las primeras horas de fermentación, debido a una mayor actividad enzimática de las poblaciones de levaduras inoculadas (*Torulaspota delbruecki*, *Hanseniaspota uvarum*) (Crafacck et al. 2013; Visintin et al. 2017; De Vuyst y Leroy 2020).

Los valores mas bajos de fructosa fueron a las 72 y 96 horas de fermentación en las muestras control. Esta disminución está correlacionada con el aumento de la concentración de ácido láctico en el mismo período. La fructosa se metaboliza ya sea homofermentativamente por glucólisis o heterofermentativamente por la vía de la fosfocetolasa a piruvato, que es el principal sustrato para la formación de manitol (notas de sabor dulzón), ácido acético y láctico (astrigencia) acetoína y diacetilo (notas de sabor mantecoso) (Crafacck et al. 2013 ; Viesser *et al.* 2020; De Vuyst y Leroy 2020).

Figura 3

Cambios en la concentración de azúcares en ausencia y presencia del pre-inóculo durante 96 horas de fermentación de almendra de cacao CCN-51.



Nota. La línea puntea (▲) representa la muestras control (sin inocular) y la línea continua (■) las muestras pre-inoculadas para **A.** Sacarosa, **B.** Glucosa, **C.** Fructosa. Cada punto representa la media \pm desviación estándar de 2 repeticiones.

Por otro lado, el contenido de glucosa fue mayor al inicio de la fermentación, siendo ligeramente superior en las muestras control, con un promedio de 17,23 mg/ g de fruto seco, sin embargo, se observó una disminución constante del contenido de glucosa hasta las 96 horas de fermentación tanto en las muestras pre-inoculadas como en el control, alcanzando valores menores a 0,30 mg/ g de fruto seco (Figura 2). La disminución de la concentración de glucosa a valores no cuantificables, se da por la síntesis de piruvato y la reducción del mismo a etanol y CO₂ por la acción de levaduras durante las primeras 24 horas de fermentación, las cuales la toman como su principal fuente de carbono; esto está relacionado al incremento de la temperatura de la masa fermentante a valores entre los 25 a 30 °C, como lo menciona Craack et al. (2013) y De Vuyst y Leroy (2020).

Cuantificación de Ácidos orgánicos (Ácido láctico, oxálico, cítrico, málico, acético)

El análisis de varianza para el contenido de ácidos orgánicos (láctico, oxálico, cítrico, málico, acético), mostro un efecto significativo para la interacción de pre-inoculo * tiempo de fermentación.

El mayor contenido de ácido cítrico se presentó en las muestras de cacao pre-inoculadas a las 24 y 72 horas de fermentación, con un promedio de 37,30 y 35,48 mg/g fruto seco respectivamente; esto se puede atribuir a un bajo consumo de citrato en los primeras horas de fermentación, debido a las poblaciones de bacterias heterofermentativas inoculadas como *Lactobacillus plantarum*, que no alteran el contenido final de ácido láctico, sin embargo reemplaza a la glucosa y al citrato por fructosa para la síntesis de ácido láctico (Viesser et al. 2020; De Vuyst y Leroy 2020).

A las 96 horas de fermentación se observó una disminución del contenido de ácido cítrico, acompañado de un aumento de las poblaciones de BAL. Según Viesser y *et al.* (2020) y

Ho et al. (2015), las bacterias heterofermentativas como *Lactobacillus fermentum*, consumen en mayor cantidad el ácido cítrico, además restringen el crecimiento de otras especies de BAL, por lo que la tendencia es hacia mayores poblaciones de la misma durante el proceso de fermentación. Al emplear un cultivo iniciador se acelera la conversión de azúcares y ácido cítrico, por ende, se observa una disminución en su contenido que da como resultado un aumento del pH a valores entre 4-4.5, esto que permite el crecimiento de especies de LAB menos tolerantes al ácido, y facilita el crecimiento de AAB (*Papalexandratou et al.* 2011; *Crafack et al.* 2013; *Ho et al.* 2015; *Santander et al.* 2019).

Por otro lado en las muestras control, se observó un incremento paulatino hasta 96 horas de fermentación con 37,42 mg/g fruto seco; la baja concentración de citrato en las primeras horas se debe al acelerado consumo del mismo por bacterias heterofermentativas que predominan en fermentaciones espontáneas (*Moreira et al.* 2013; *Ho et al.* 2015; *Viesser et al.* 2020), sin embargo el ácido málico puede transformarse, mediante el ciclo de Krebs, a citrato aumentando su concentración al final de la fermentación para continuar con la producción de ácido láctico y acético (*Volschenk et al.* 2006). Según *Santander et al.* (2019), la concentración inicial de citrato está influenciado por las características genotípicas de la variedad, que influyen en la composición de la pulpa la cual puede contener valores entre 1 al 3 %.

Concomitantemente se observó un incremento del contenido de ácido láctico siendo ligeramente mayor en las muestras control a las 96 h de fermentación respecto a las muestras pre-inoculadas, con un promedio de 15,77 mg/g fruto, valores similares a los obtenidos por *Ho et al.* (2015). Sin embargo *Ramos et al.* (2014), menciona que la concentración de ácido láctico es mayor en híbridos inoculados y que ésta se mantiene constante después de las 108 horas de fermentación.

Se observó un incremento constante de ácido acético, siendo ligeramente mayor en las muestras control de cacao a las 96 h de fermentación con un promedio de 4,02 mg/g fruto seco, valores similares a los encontrados en las almendras por Papalexandratou *et al.* (2011), Moreira *et al.* (2013) y Ho *et al.* (2015). El Etanol producido por levaduras es transformado principalmente en ácido acético, el cual ingresa paulatinamente a los cotiledones, esto provoca un cambio en la estructura sub-celular, mata al embrión e hidrata a las proteínas contenidas en los cotiledones, volviéndolas susceptibles a la acción de las proteasas a una temperatura de entre 40-45 °C (Vuyst y Weckx 2015; Santander *et al.* 2019; De Vuyst y Leroy 2020).

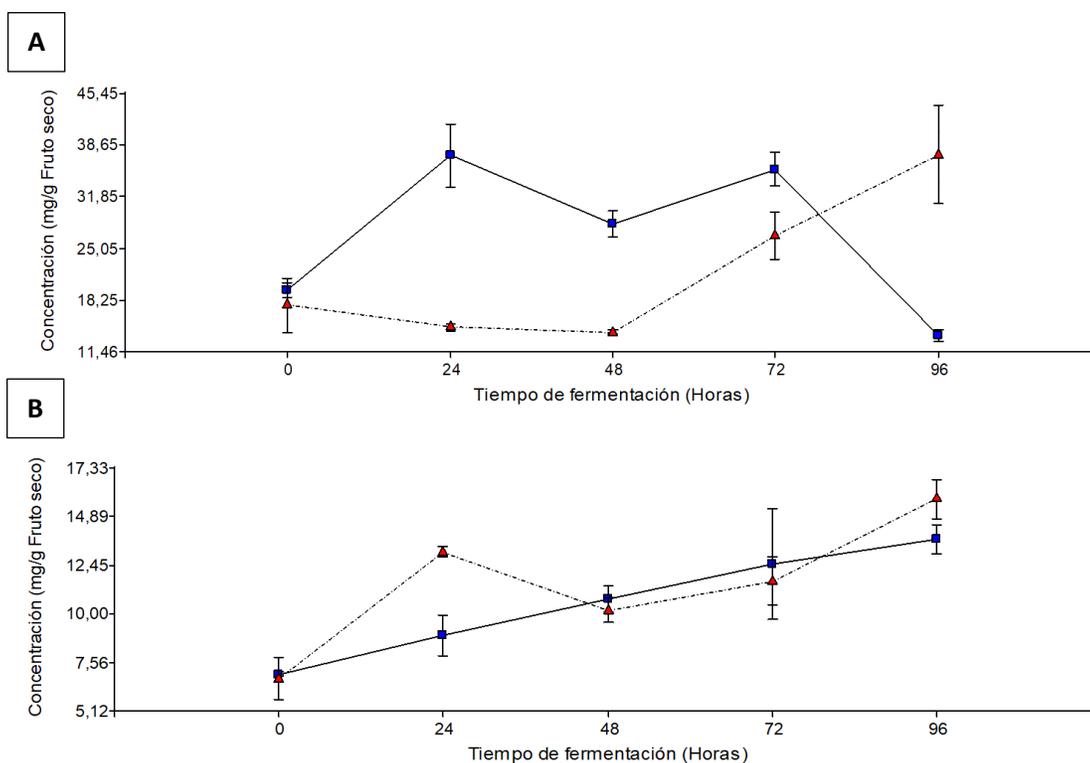
En la síntesis de ácido acético, predomina la presencia de *Acetobacter pasteurianus*, la que limita el crecimiento de AAB oportunistas como *A. ghanensis* y *A. senegalensis*, por lo cual no tienen un efecto significativo durante la fermentación (Papalexandratou *et al.* 2011). Vale mencionar que un alto contenido de ácido acético puede provocar un sabor ácido y amargo en las almendras fermentadas (Bastidas *et al.* 2015; Santander *et al.* 2019).

En cuanto al contenido de ácido málico se observó un mayor incremento en las muestras pre-inoculadas a las 96 h de fermentación con un promedio de 4,56 mg/g fruto seco, lo que difiere a lo informado por Ho *et al.* (2015), quienes observaron que los niveles se redujeron a de 11-8 a 1.5 -3 mg/ g en pulpa, manteniéndose constante en la almendra. Esto se puede atribuir a una mayor población de Fructubacillus en las últimas horas de fermentación, como *Leuconostoc pseudomesenteroides* cuyo crecimiento es favorecido por el alto contenido de etanol y de fructosa, misma que se encarga de realizar la fermentación maloláctica metabolizando el ácido cítrico en ácido oxaloacético y reduciéndolo a malato por acción de la enzima malato deshidrogenasa (Volschenk *et al.* 2006; Viesser *et al.* 2020).

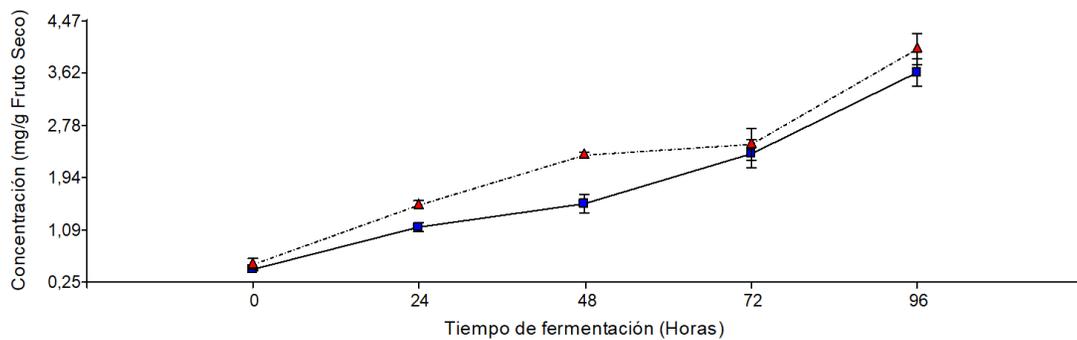
Para el caso del ácido oxálico su pico máximo se presentó a las 96 h de fermentación en las muestras control, a diferencia de las muestras pre- inoculadas cuyos picos se presentaron a las 24 y 72 h de fermentación, alcanzando valores promedios de 9,5 y 10,54 mg/ g fruto seco, respectivamente. Según Ho et al. (2015), la presencia de ácido oxálico ocurre en las almendras, mas no en la pulpa, por lo que su mayor concentración se observa al finalizar la fermentación. Sin embargo Dircks (2009), Volschenk *et al.* (2006) y Agyrifo *et al.* (2019), mencionan que tanto el ácido málico, oxálico y tartárico pueden ser producidos en pequeñas cantidades por levaduras y ser constantes durante todo el proceso fermentativo.

Figura 4

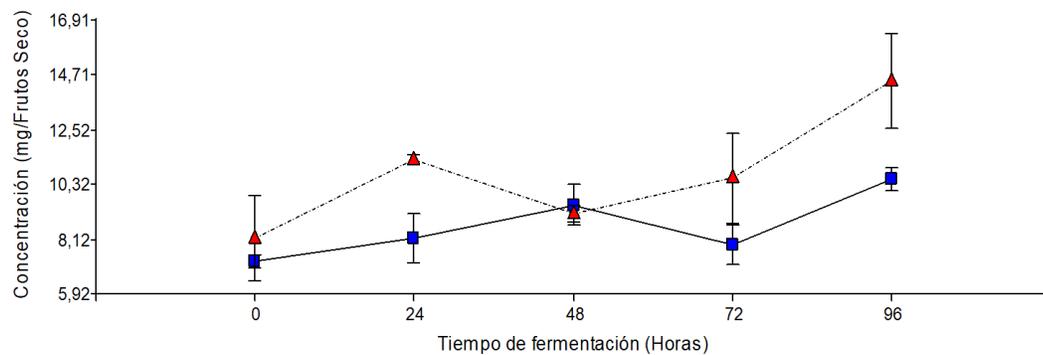
Cambios en la concentración de ácidos orgánicos en ausencia y presencia del pre-inóculo durante 96 horas de fermentación.



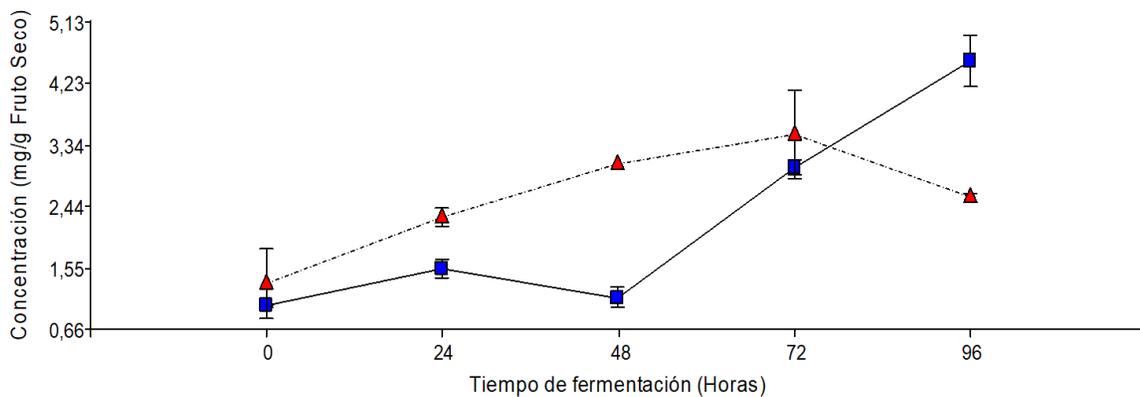
C



D



E



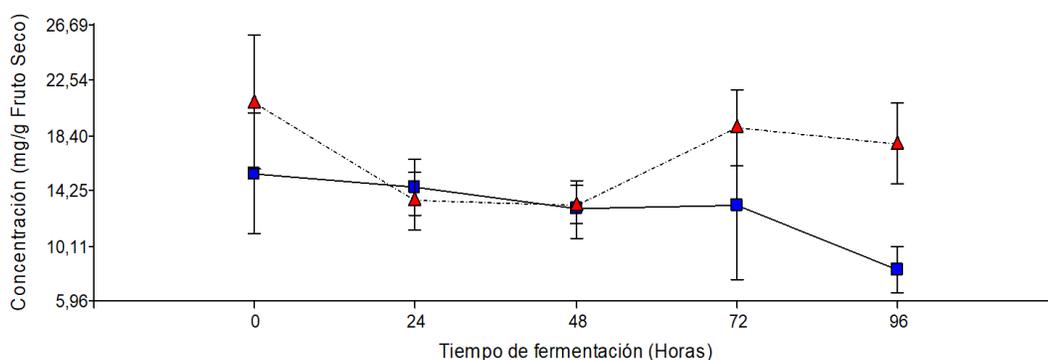
Nota. La línea puntea (▲) representa la muestras control (sin inocular) y la línea continua (■) las muestras pre-inoculadas para **A.** A. Cítrico, **B.** A. Láctico, **C.** A. Acético, **D.** A. Oxálico, **E.** A. Málico. Cada punto representa la media \pm desviación estándar de 2repeticiones.

Cuantificación del Contenido total de polifenoles

El análisis de varianza para el contenido polifenoles, no mostró un efecto significativo para la interacción de pre-inoculo * tiempo de fermentación, ni para los efectos independientes de cada factor ($p > 0,05$).

Figura 5

Concentración de ácido oxálico en almendra de cacao pre-inoculada con un cultivo iniciador, durante 96 horas de fermentación.



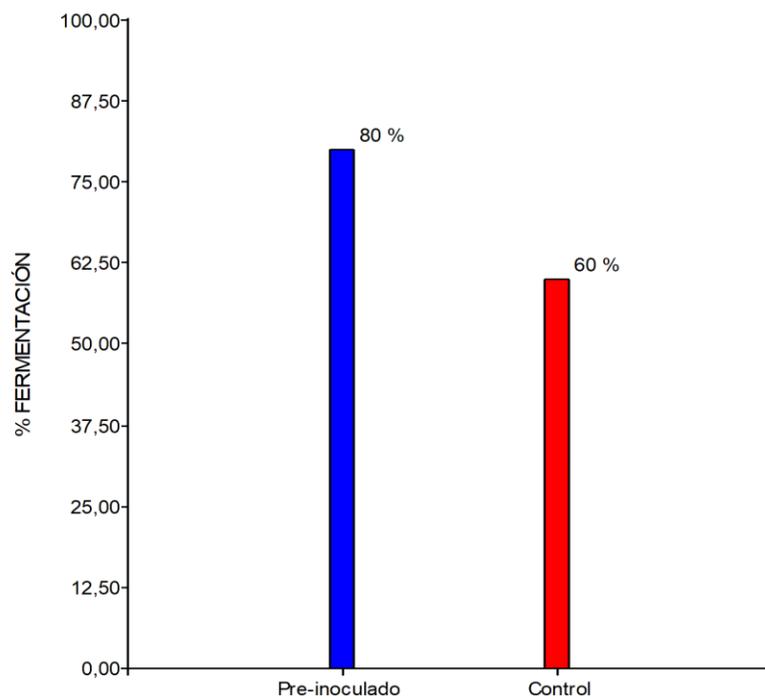
Nota. La línea puntea (▲) representa la muestras control (sin inocular) y la línea continua (■) las muestras pre-inoculadas. Cada punto representa la media \pm desviación estándar de 2 repeticiones.

Prueba de corte

De las 100 almendras evaluadas a las 96 horas fermentación, las muestras pre-inoculadas presentaron el 80% de granos bien fermentados, valor superior a las muestras control, las cuales alcanzaron el 60 % de granos bien fermentados; el porcentaje restante representa a almendras no fermentadas, con manchas blancas y sobre fermentados. No se observó la presencia de almendras germinas o como mohos.

Figura 6

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



Nota. La barra de color rojo representa las muestras control (sin inocular) y la barra azul las muestras pre- inoculadas.
El cuadro representa la media \pm desviación estándar de 2 repeticiones.

Capítulo V

Conclusiones y Recomendaciones

Conclusiones

La dinámica poblacional del proceso de fermentación está fuertemente influenciada por las condiciones de la masa fermentante (pH, Temperatura y oxígeno). En base a esto durante el proceso de fermentación tanto para las muestras control como pre-inoculadas el pH, alcanzó valores entre 4.0 a 4.5 al final de la fermentación, siendo favorable para la actividad microbiana, enzimática y la degradación de proteínas. La temperatura fue mayor en las muestras pre inoculas a las 96 horas de fermentación superando los 45 °C, esto contribuyó a la reducción de las poblaciones de hongos filamentosos y enteras bacterias que afectan a la calidad final de la almendra.

La población de levaduras se mantuvo durante todo el proceso de fermentación, sin embargo, fue mayor para las muestras pre-inoculas durante las primeras horas. La actividad enzimática de las levaduras inoculadas (*Torulaspota dulbruecki* y *Hanseniaspota uvarum*) aceleró la hidrólisis de la sacarosa en glucosa y fructosa, lo que se correlacionó con el incremento de su contenido. Sin embargo, la glucosa disminuyó abruptamente después de las 24 horas de fermentación, por ser la principal fuente de carbono consumida por las levaduras para la síntesis de etanol, ésteres, aldehídos entre otros compuestos aromáticos.

Las bacterias ácido lácticas crecieron hasta las 48 horas de fermentación con poblaciones de $10^7 - 10^8$ UFC/ml, al emplear *Lactobacillus plantarum* como parte del cultivo iniciador, su crecimiento fue favorecido por el alto contenido disponible de fructosa, por lo que la población fue ligeramente mayor en las muestras pre-inoculadas. Estas muestras presentaron un alto contenido de ácido cítrico, a diferencia de las muestras control, las que al ser una

fermentación espontánea tiende a tener en mayor cantidad de cepas heterofermentativas como *Lactobacillus fermentum*, las cuales utilizan principalmente citrato para la síntesis de ácido láctico, por ende, se observó un mayor contenido de lactato en las muestras control. La población de bacterias ácido acéticas decreció desde el inicio de la fermentación, a causa de las condiciones anaerobias en las primeras 48 horas del proceso y al bajo contenido de etanol disponible, por otro lado la cepa *Acetobacter ghanensis* inoculada no toleró las altas temperaturas, por ende su población desapareció y fue sustituida por *Acetobacter pausterianus*, lo que se evidencia con un repunte a las 96 horas de fermentación, acompañado de un incremento en el contenido de ácido acético, málico y oxálico.

Al final de la fermentación se obtuvo el 80 % de las almendras bien fermentadas en las muestras pre-inoculadas, lo que evidencia la aceleración del proceso de fermentación y la eficiencia del cultivo iniciador.

Recomendaciones

Como para del proceso de fermentación, usar el género *Bacillus* como cultivo iniciador, ya que según estudios tiene la capacidad de producir una variedad de compuestos químicos, incluido el 2,3-butanodiol, pirazinas, ácido acético y ácido láctico, en condiciones fermentativas, que podrían contribuir a mejorar la acidez y quizás reducir o eliminar sabores desagradables del cacao fermentado.

Evaluar el contenido de etanol durante el proceso de fermentación, ya que es un parámetro que influye en la sinergia entre la población microbiana y la producción de azúcares y ácidos orgánicos.

Para tener un conocimiento más específico de cómo puede influir un cultivo iniciador realizar un estudio de la fase de secado y tostado de las almendras, complementado con un estudio final de cata de chocolate.

Como parte de la investigación se requiere conocer las principales cepas de microorganismos que predominen en el proceso de fermentación en Ecuador en las principales variedades cacao y su influencia en el proceso de fermentación, de tal manera se pueda establecer cultivos iniciadores que pueda ser inoculados en diferentes tiempos del proceso y que sean afines con la calidad, genética y condición ambiental de nuestro medio.

Referencias bibliográficas

- Agyrifo, D., Wamalwa, M., Otwe, E., Galyuon, I., Runo, S., Takrama, J., & Ngeranwa, J. (2019). Metagenomics analysis of cocoa bean fermentation microbiome identifying species diversity and putative functional capabilities. *Heliyon*.
- Anecacao. (2015). *Historia del Cacao*. Obtenido de <http://www.anecacao.com/index.php/es/quienes-somos/historia-del-cacao.html>
- Anecacao. (2019). *Sector exportador de Cacao*. Asociación Nacional de Exportador de Cacao.
- Ardhana, M., & Fleet, G. (2003). The microbial ecology of cocoa bean fermentations in Indonesia. *International Journal of Food Microbiology*, 87-99.
- Bastidas, L. (2009). *El cultivo de Cacao*. República Dominicana: Centro para el Desarrollo Agropecuario y Forestal, Inc. (CEDAF).
- Bastidas, N., Ramos, C., Dias, D., Marques, A., & Freitas, R. (2015). The impact of yeast starter cultures on the microbial communities and volatile compounds in cocoa fermentation and the resulting sensory attributes of chocolate. *Food Sci Technol*, 1101-1010.
- Camu, N., Winter, T., Addo, S., Takrama, J., Bernaert, H., & De Vuyst, L. (2008). Fermentation of cocoa beans: influence of microbial activities and polyphenol concentrations on the flavour of chocolate. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 2288-2297.
- Castro, E., Idrogo, G., Siche, R., & Cardenas, F. (2019). Formation of aromatic compounds precursors during fermentation of Criollo and Forastero cocoa. *Heliyon*.
- Coexca. (2017). *Guía de buenas prácticas de cosecha, fermentación y secado para la producción de cacaos especiales*. Colombia: Embajada de Suiza en Colombia.
- Copetti, M., Iamanaka, B., Pitt, J., & Taniwaki, M. (2014). Fungi and mycotoxins in cocoa: From farm to chocolate. *International Journal of Food Microbiology*, 13-20.
- Costaguta, M. (2008). *Chocolate*. Alabtros.
- Crafack, M., Mikkelsen, M., Saerens, S., Knudsen, M., Blennow, A., Lowor, S., . . . Heimdal, H. (2013). Influencing cocoa flavour using *Pichia kluyveri* and

- Kluyveromyces marxianus in a defined mixed starter culture for cocoa fermentation. *International Journal of Food Microbiology*, 1-14.
- Dai, J., Wu, Y., Chen, S.-w., Zhu, S., Yin, H.-p., Wang, M., & Tang, J. (2010). Sugar compositional determination of polysaccharides from *Dunaliella salina* by modified RP-HPLC method of precolumn derivatization with 1-phenyl-3-methyl-5-pyrazolone. *Carbohydrate Polymers*, 629-635.
- De la Cruz, J., Vargas, M., & Del Angel, O. (2009). *CACAO: Operaciones Poscosecha*. FAO.
- De Vuyst, L., & Leroy, F. (2020). Functional role of yeasts, lactic acid bacteria and acetic acid bacteria in cocoa fermentation processes. *FEMS Microbiology Reviews*, 432-453.
- De Vuyst, L., & Weckx, S. (2015). The cocoa bean fermentation process: from ecosystem analysis to starter culture development. *Journal of Applied Microbiology*, 5-17.
- Di Rienzo, J., Balzarini, M., González, L., Casanoves, F., Tablada, M., & Robledo, C. (2018). *Infostat versión 2018*. Universidad Nacional de Córdoba: Grupo Infostat. Obtenido de Grupo Infostat.
- Dircks, H. (2009). *Investigation into the fermentation of Australian cocoa beans and its effect on microbiology, chemistry and flavour*. Australia: University of New South Wales School of Chemical Sciences and Engineering.
- Dutan, S., Amaya, J., Nugra, F., & Palacios, B. (2015). *iagnostico territorial por componentes del cantón Vinces*. CEGESTOR.
- EL Telégrafo. (02 de Junio de 2008). *Consumo de chocolate en Ecuador es de los más bajos en la región*. Obtenido de EL Telégrafo: <https://www.eltelegrafo.com.ec/noticias/economia/4/salon-chocolate-ecuador-comercio>
- Enríquez, G. (2010). *Cacao orgánico. Guía para productores ecuatorianos*. Quito: Instituto Nacional Autónomo de Investigaciones Agropecuarias.

- Gálvez, S., Loiseau, G., Paredes, J., Barel, M., & Pierre, J. (2007). Study on the microflora and biochemistry of cocoa fermentation in the Dominican Republic. *International Journal of Food Microbiology*, 124-130.
- Ginatta, G., Vignati, F., & Rodríguez, M. (2018). *Observatorio Del Cacao Fino Y De Aroma Para América Latina. Iniciativa Latinoamericana Del CACAO*. CAF.
- Hashim, P., Selamat, J., Syed, S., & Ali, A. (1998). Changes in Free Amino Acid, Peptide-N, Sugar and Pyrazine Concentration during Cocoa Fermentation. *Society of Chemical Industry*, 535-542.
- Ho, V., Zhao, J., & Fleet, G. (2015). The effect of lactic acid bacteria on cocoa bean fermentation. *International Journal of Food Microbiology*, 54-67.
- INEN. (2018). *GRANOS DE CACAO. REQUISITOS*. Quito: INEN-Quinta Edición.
- Jespersen, L., Nielsen, D., Honholt, S., & Jakobsen, M. (2005). Occurrence and diversity of yeasts involved in fermentation of West African cocoa beans. *Federation of European Microbiological Societies*, 444-449.
- Lopez, A., & Passo, F. (1985). *Factors influencing cacao bean acidity--fermentation, drying and the microflora*.
- MAG. (2018). *RENDIMIENTOS DE CACAO ALMENDRA SECA (Theobroma cacao) EN EL ECUADOR 2017*. Quito: MAG.
- MAG. (2020). *Sistema de Información Pública Agropecuaria del Ecuador*. Obtenido de Ministerio de Agricultura y Ganadería. : <http://sipa.agricultura.gob.ec/>
- Medeiros, C., Mattos, C., Pires, J., Marcos, E., & Tsai, S. (2007). Effect of phytate and storage conditions on the development of the 'hard-to' phenomenon in common beans. *Science of Food and Agriculture*, 1237-1243.
- Minagri. (2019). *Observatorio de commodities: Cacao*. Perú: Dirección General de Políticas Agrarias - Dirección de Estudios Económicos e Información Agraria.
- Moens, F., Lefeber, T., & De Vuyst, L. (2014). Oxidation of Metabolites Highlights the Microbial Interactions and Role of *Acetobacter pasteurianus* during Cocoa Bean Fermentation. *Environmental Microbiology*, 1848-1857.

- Muñoz, A., & Gomez, 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*". Quito: Universidad de las Américas .
- Papalexandratou, Z., Falony, G., Romanens, E., Jimenez, J., Amores, F., & De Vuyst, L. (2011). Species Diversity, Community Dynamics, and Metabolite Kinetics of the Microbiota Associated with Traditional Ecuadorian Spontaneous Cocoa Bean Fermentations. *Applied and Environmental Microbiology*, 7698-7714.
- Predan, M., Lazar, D., & Lungu, L. (2019). *Cocoa Industry—From Plant Cultivation to Cocoa Drinks Production*. 457-489.
- Quingaísa, E., & Riveros, H. (2007). *ESTUDIO DE CASO: DENOMINACION DE ORIGEN "CACAO ARRIBA"*. FAO - IICA.
- Quintero, M., & Días, M. (2004). El mercado mundial del cacao. *Agrolimentaria*.
- Ramos, C., Dias, D., Da Cruz, M., & Schawan, R. (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*, 908-918.
- Salous, A., Angulo, A., & Solís, L. (2019). Acceleration of cocoa fermentation through the action of bacteria (*Acetobacter aceti*) and yeast (*Saccharomyces cerevisiae*). *Espirales*, 1-20.
- Sandhya, M., Yallapa, M., Varadaraj, M., Puranaik, J., Jaganmohan, L., Janardhan, P., & Murthy, S. (2015). Inoculum of the starter consortia and interactive metabolic process in enhancing quality of cocoa bean (*Theobroma cacao*) fermentation. *Food Science and Technology*.
- Santander, M., Rodríguez, J., Vaillant, F., & Escobar, S. (2019). An overview of the physical and biochemical transformation of cocoa seeds to beans and to chocolate: Flavor formation. *Food Science and Nutrition*.
- Sarbu, I., & Csutak, O. (2019). The Microbiology of cocoa fermentation. *Faculty of Biology, Department of Genetics, University of Bucharest*, .

- Schwan, R., De Melo Pereira, G., & Fleet, G. (2016). Microbial Activities during cocoa fermentation. 172-176.
- Sevilla, J. (2007). *Elaboración del chocolate, una técnica dulce y ecológica*.
- Teneda, W. (2016). *Mejoramiento del Proceso de Fermentación del Cacao*. Sevilla: Universidad Internacional de Andalucía.
- Vázquez, A., Ovando, I., Adriano, L., Betancur, D., & Salvador, M. (2016). Alcaloides y polifenoles del cacao, mecanismos que regulan su biosíntesis y sus implicaciones en el sabor y aroma. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*, 239-251.
- Veiga Moreira , I., Cruz Pedrozo, M., Ferreira , W., Ribeiro, D., & Freitas , R. (2013). Microbial succession and the dynamics of metabolites and sugars during the fermentation of three different cocoa (*Theobroma cacao* L.) hybrids. *Food Research International*, 9-17.
- Viesser, J., De Melo, G., De Carvalho, D., Vandenberghe, L., Soccol, C., Azevedo,, B., & Rogez, G.-N. (2020). Exploring the contribution of fructophilic lactic acid bacteria to cocoa beans fermentation: isolation, selection and evaluation. *Food Research international*.
- Visintin, S., Lacerda, C., Nara, N., Dolci, P., Freitas, R., & Cocolin, L. (2017). Impact of *Saccharomyces cerevisiae* and *Torulaspora delbrueckii* starter cultures on cocoa beans fermentation. *International Journal of Food Microbiology*.
- Volschenk, H., Van Vuuren, H., & Viljoen-Bloom, M. (2006). Malic Acid in Wine: Origin, Function and Metabolism during Vinification. *South African Journal of Enology and Viticulture* , 123-136.
- Yáñez, V., & Falconí, C. (2007). El cacao: historia,biología y datos agrícolas. En C. Falconí, V. Yáñez, A. Oleas, S. Von Rutten, D. Peralto, & L. Saavedra, *El cacao; historia,biología y datos agrícolas*. In *Validación de biopesticidas para el control de la moniliasis y manejo sustentable del cacao fino y aroma en el Ecuador*. (págs. 1-12). Quito: Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE.