



ESPE
UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS
INNOVACIÓN PARA LA EXCELENCIA

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA Y DE LA AGRICULTURA

CARRERA DE INGENIERÍA AGROPECUARIA SANTO DOMINGO

**TESIS PREVIO A LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO DE
INGENIERO AGROPECUARIO**

TEMA: “EVALUACIÓN DE LA APLICACIÓN DE *Lactobacillus fermentum* Y *Acetobacter aceti*, EN LA FERMENTACIÓN DEL CACAO CCN-51 Y SU EFECTO EN LA CALIDAD DE LAS ALMENDRAS”

**AUTORES: ERAZO TORRES ROBINSON FERNANDO
MENDOZA LOOR CYNDI MIREYA**

**DIRECTOR: Ing. JORGE REINA FIERRO M. Sc.
CODIRECTOR: Ing. PATRICIO VACA PAZMIÑO Mg.**

SANTO DOMINGO

2015

CERTIFICACIÓN

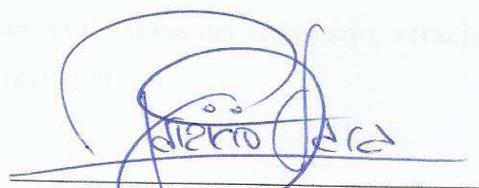
Los suscritos, docentes de la Carrera de Ingeniería Agropecuaria, Santo Domingo, certificamos que el Proyecto de Investigación de Grado titulado **“EVALUACIÓN DE LA APLICACIÓN DE *Lactobacillus fermentum* Y *Acetobacter aceti*, EN LA FERMENTACIÓN DEL CACAO CCN-51 Y SU EFECTO EN LA CALIDAD DE LAS ALMENDRAS”** cumple las disposiciones reglamentarias establecidas en la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE.

Esta investigación desarrollada por los señores egresados ERAZO TORRES ROBINSON FERNANDO; MENDOZA LOOR CYNDI MIREYA, fue guiada en forma permanente por nuestra parte en las conclusiones y recomendaciones.

Santo Domingo, _____ de _____ del 2015



Ing. JORGE REINA FIERRO M. Sc.
DIRECTOR.



Ing. PATRICIO VACA PAZMIÑO Mg.
CODIRECTOR.

AUTORÍA DE RESPONSABILIDAD

ERAZO TORRES ROBINSON FERNANDO

Y

MENDOZA LOOR CYNDI MIREYA

Declaramos que:

El proyecto de grado denominado **“EVALUACIÓN DE LA APLICACIÓN DE *Lactobacillus fermentum* Y *Acetobacter aceti*, EN LA FERMENTACIÓN DEL CACAO CCN-51 Y SU EFECTO EN LA CALIDAD DE LAS ALMENDRAS”**, fue desarrollado en base a una investigación exhaustiva, respetando derechos intelectuales de terceros, conforme las citas que constan al pie de las páginas correspondientes, cuyas fuentes se incorporan en la bibliografía. Consecuentemente este trabajo es de nuestra autoría.

En virtud de esta declaración, nos responsabilizamos del contenido, veracidad y alcance científico del proyecto de grado en mención.

Santo Domingo, _____ de _____ del 2015



ERAZO TORRES
ROBINSON FERNANDO



MENDOZA LOOR
CYNDI MIREYA

AUTORIZACIÓN

ERAZO TORRES ROBINSON FERNANDO

Y

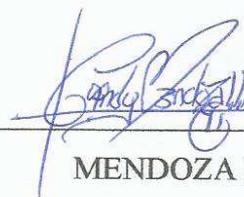
MENDOZA LOOR CYNDI MIREYA

Autorizamos a la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE la publicación, en la biblioteca virtual de la Institución del trabajo **“EVALUACIÓN DE LA APLICACIÓN DE *Lactobacillus fermentum* Y *Acetobacter aceti*, EN LA FERMENTACIÓN DEL CACAO CCN-51 Y SU EFECTO EN LA CALIDAD DE LAS ALMENDRAS”**, manifestamos que el contenido, ideas y discusiones son de nuestra exclusiva responsabilidad y autoría.

Santo Domingo, _____ de _____ del 2015



ERAZO TORRES
ROBINSON FERNANDO



MENDOZA LOOR
CYNDI MIREYA

DEDICATORIA

Dedico el proyecto de investigación en primer lugar a Dios, por haberme permitido llegar hasta este punto, darme la salud y fortaleza para lograr mis objetivos, además de su infinita bondad y amor.

A mi Padre Edison Erazo y mi Madre Rosana Torres por haberme apoyado en todo momento, por sus consejos, sus valores que me ha permitido ser una persona de bien pero más que nada por su amor.

A mis hermanos Geovanny, Steven y Yajaira que siempre han estado ayudándome incondicionalmente y han sido mi motivación constante para seguir adelante y a todos mis familiares que participaron directa o indirectamente en la elaboración de esta tesis.

Robinson Fernando Erazo Torres

DEDICATORIA

“Esta dedicatoria va dirigida con mucho cariño para las personas que estuvieron en esos tiempos importantes de mi vida”.

A Dios que sin él, nada es posible en la vida.

A mis padres Diego Botero y Ana María Loor, que me apoyaron incondicionalmente siempre en todas las etapas de mi vida, especialmente para mi madre mujer fuerte, luchadora digna de admirar que con sus consejos y esfuerzos siempre estuvo a mi lado, para ella mi más grande dedicatoria.

A mis hermanas Jessica y Valentina por su gran apoyo en todo el camino de mi vida.

A mi esposo Rolando Iglesias, por ser un soporte incondicional de amor y compañía en la ejecución de mi tesis.

Cyndi Mireya Mendoza Loor

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE, Carrera de Ingeniería en Ciencias Agropecuarias Santo Domingo, por participar en mi formación moral e intelectual.

Al Ing. Jorge Reina y Patricio Vaca, Director y Codirector del proyecto de investigación, por sus consejos y aportaciones que permitieron la culminación de este trabajo.

Al Ing. Vinicio Uday, por el apoyo ofrecido y por impulsar el desarrollo de nuestra formación profesional.

Robinson Fernando Erazo Torres

AGRADECIMIENTOS

Mis más sinceros agradecimientos a las siguientes personas e instituciones que me brindaron su apoyo para que se lleve a cabo este trabajo de investigación.

A mi amada madre, por su apoyo incondicional.

A la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE, en especial a la Carrera de Ingeniería en Ciencias Agropecuarias Santo Domingo.

A los Ings. Jorge Reina y Patricio Vaca, Director y Codirector del proyecto de investigación, respectivamente; por su ayuda en el desarrollo del presente trabajo.

Al Ing. Vinicio Uday, por la ayuda prestada para la culminación de este trabajo.

A mis profesores que además de ser educadores, fueron amigos.

A mi compañero de tesis Robinson Erazo y a todas las personas que, de una u otra manera colaboraron y compartieron interés para llevar a término este proyecto.

Cyndi Mireya Mendoza Loor

CONTENIDO

CERTIFICACIÓN	ii
AUTORÍA DE RESPONSABILIDAD	iii
AUTORIZACIÓN	iv
DEDICATORIA	v
AGRADECIMIENTOS	vii
CONTENIDO	ix
INDICE DE CUADROS	xii
INDICE DE FIGURAS	xv
INDICE DE ANEXOS	xvii
RESUMEN	xviii
ABSTRACT	xix
I. INTRODUCCIÓN	1
II. REVISIÓN DE LITERATURA	3
2.1. HISTORIA DEL CACAO	3
2.2. EL CULTIVO DE CACAO EN EL ECUADOR	3
2.2.1. EL Cultivo Cacao en Santo Domingo de los Tsáchilas.....	4
2.3. CLASIFICACIÓN GENÉTICA DEL CACAO.....	4
2.3.1. Cacao Criollo.....	5
2.3.2. Cacao Forastero	5
2.3.3. Cacao Trinitario.....	5
2.3.4. Cacao Nacional.....	7
2.4. REQUERIMIENTOS AGROCLIMÁTICOS.....	7
2.5. BENEFICIO DEL CACAO	8
2.5.1. Cosecha de Mazorca.....	8
2.5.2. Fermentación	9
2.5.3. Secado	16
2.5.4. Limpieza y Selección	17
2.5.5. Almacenamiento.....	17
2.6. CALIDAD DEL CACAO	17
2.6.1. Calidad Física de las Almendras de Cacao.....	18

2.6.2.	Composición Química de las Almendras de Cacao	21
2.6.3.	Calidad Organoléptica de las Almendras de Cacao	25
III.	MATERIALES Y MÉTODOS	27
3.1.	UBICACIÓN DEL LUGAR DE INVESTIGACIÓN	27
3.1.1.	Ubicación Política	27
3.1.2.	Ubicación Geográfica.....	27
3.1.3.	Ubicación Ecológica.....	27
3.2.	MATERIALES	30
3.2.1.	Materiales de campo.....	30
3.2.2.	Materiales de Laboratorio	30
3.2.3.	Insumos	30
3.3.	MÉTODOS	31
3.3.1.	Diseño Experimental	31
3.3.2.	Análisis Estadístico	33
3.3.3.	Variables a Medir	34
3.3.4.	Métodos Específicos del Manejo del Experimento.....	38
IV.	RESULTADOS	46
4.1.	TEMPERATURA DE LA MASA DE CACAO EN FERMENTACIÓN	46
4.2.	PESO DE LAS ALMENDRAS DE CACAO AL FINAL DE LA FERMENTACIÓN	48
4.3.	PESO DE LAS ALMENDRAS DE CACAO AL FINAL DEL SECADO	50
4.4.	INDICE DE SEMILLA.....	51
4.5.	GRADO DE FERMENTACIÓN.....	52
4.6.	CONTENIDO DE GRASA.....	55
4.7.	pH DE LAS ALMENDRAS DE CACAO.....	56
4.8.	ACIDEZ TITULABLE	58
4.9.	TEOBROMINA.....	60
4.10.	CAFEÍNA	62
4.11.	RELACIÓN TEOBROMINA/CAFEÍNA	63

4.12.	POLIFENOLES	65
V.	DISCUSION	68
5.1.	TEMPERATURA DE LA MASA DE CACAO EN FERMENTACIÓN	68
5.2.	PESO DE LAS ALMENDRAS DE CACAO AL FINAL DE LA FERMENTACIÓN	68
5.3.	PESO DE LAS ALMENDRAS DE CACAO AL FINAL DEL SECADO	69
5.4.	INDICE DE SEMILLA.....	69
5.5.	GRADO DE FERMENTACIÓN	70
5.6.	CONTENIDO DE GRASA.....	72
5.7.	POTENCIAL DE HIDROGENO (pH)	72
5.8.	ACIDEZ TITULABLE	74
5.9.	TEOBROMINA.....	75
5.10.	CAFEÍNA	76
5.11.	RELACIÓN TEOBROMINA/CAFEÍNA	77
5.12.	POLIFENOLES	77
VI.	CONCLUSIONES	79
VII.	RECOMENDACIONES	80
VIII.	BIBLIOGRAFÍA	81
IX.	ANEXOS.....	91

INDICE DE CUADROS

Cuadro 1.	Tabla de requisitos de la calidad del cacao beneficiado.	20
Cuadro 2.	Valores de la relación Teobromina/Cafeína para diferentes grupos genéticos de cacao.	24
Cuadro 3.	Promedio de temperatura y humedad relativa ambiental, correspondiente a la fase de campo de la investigación.	28
Cuadro 4.	Tratamientos de la investigación “Evaluación de la aplicación de <i>Lactobacillus fermentum</i> y <i>Acetobacter aceti</i> , en la fermentación del cacao CCN-51 y su efecto en la calidad de las almendras”.	32
Cuadro 5.	Esquema de análisis de varianza.	33
Cuadro 6.	Análisis de varianza de la temperatura a las 48 horas de fermentación de las almendras de cacao, en función a al factor de la aplicación de bacterias.	46
Cuadro 7.	Análisis de varianza del peso de las almendras de cacao al final de la fermentación, en función a los factores de la aplicación de bacterias, tiempo de fermentación e interacción entre aplicación de bacterias x tiempo de fermentación.	48
Cuadro 8.	Análisis de varianza del peso de las almendras de cacao al final del secado, en función a los factores de la aplicación de bacterias, tiempo de fermentación e interacción entre aplicación de bacterias x tiempo de fermentación.	50
Cuadro 9.	Análisis de varianza del índice de semilla (IS), al 7% de humedad, en función a los factores de la aplicación de bacterias, tiempo de fermentación e interacción entre aplicación de bacterias x tiempo de fermentación.	51
Cuadro 10.	Análisis de varianza del grado de fermentación, en función a los factores de la aplicación de bacterias, tiempo de fermentación e interacción entre aplicación de bacterias x tiempo de fermentación.	52

Cuadro 11.	Análisis de varianza del contenido de grasa, en función a los factores de la aplicación de bacterias, tiempo de fermentación e interacción entre aplicación de bacterias x tiempo de fermentación.	55
Cuadro 12.	Análisis de varianza del pH de las almendra de cacao, en función a los factores de la aplicación de bacterias, tiempo de fermentación e interacción entre aplicación de bacterias x tiempo de fermentación.	56
Cuadro 13.	Análisis de varianza de la acidez titulable de las almendra de cacao, en función a los factores de la aplicación de bacterias y tiempo de fermentación.	58
Cuadro 14.	Análisis de varianza de la teobromina, en función a los factores de la aplicación de bacterias y tiempo de fermentación.	60
Cuadro 15.	Análisis de varianza de cafeína, en función a los factores de la aplicación de bacterias, tiempo de fermentación e interacción entre aplicación de bacterias x tiempo de fermentación.	63
Cuadro 16.	Análisis de varianza de la teobromina/cafeína, en función a los factores de la aplicación de bacterias, tiempo de fermentación e interacción entre aplicación de bacterias x el tiempo de fermentación.	64
Cuadro 17.	Análisis de varianza de polifenoles, en función a los factores de la aplicación de bacterias, tiempo de fermentación e interacción entre aplicación de bacterias x el tiempo de fermentación.	66
Cuadro 18.	Prueba de tukey al 5 % del peso de las almendras al final de la fermentación.	¡Error! Marcador no definido.
Cuadro 19.	Prueba de tukey al 5 % del peso de las almendras al final del secado.....	¡Error! Marcador no definido.
Cuadro 20.	Prueba de tukey al 5 % de la variable índice de semilla (IS);	¡Error! Marcador no

- Cuadro 21. Prueba de tukey al 5 % de la variable fermentación de las almendras de cacao **¡Error! Marcador no definido.**
- Cuadro 22. Prueba de tukey al 5 % de la variable contenido de grasa de las almendras de cacao..... **¡Error! Marcador no definido.**
- Cuadro 23. Prueba de tukey al 5 % de la variable pH de las almendras de cacao **¡Error! Marcador no definido.**
- Cuadro 24. Prueba de tukey al 5 % de la variable acidez titulable de las almendras de cacao **¡Error! Marcador no definido.**
- Cuadro 25. Prueba de tukey al 5 % de la variable teobromina de las almendras de cacao **¡Error! Marcador no definido.**
- Cuadro 26. Prueba de tukey al 5 % de la variable cafeína de las almendras de cacao **¡Error! Marcador no definido.**
- Cuadro 27. Prueba de tukey al 5 % de la variable relación teobromina/cafeína de las almendras de cacao;**¡Error! Marcador no definido.**
- Cuadro 28. Prueba de tukey al 5 % de la variable polifenoles de las almendras de cacao **¡Error! Marcador no definido.**

INDICE DE FIGURAS

Figura 1.	Ubicación geográfica del proyecto de investigación.	29
Figura 2.	Croquis del diseño de campo.	33
Figura 3.	Temperatura de la masa fermentable a las 48 horas de fermentación entre comparaciones de a2 vs. a0, a1 (a), y a0 vs. a1 (b).	47
Figura 4.	Temperatura de la masa fermentable desde el inicio al final de la fermentación, promedio de temperatura del factor a0 y a2 (a), y promedio de temperatura del factor a1 (b).	48
Figura 5.	Peso de las almendras de cacao al final de la fermentación en función al factor tiempo de fermentación.	49
Figura 6.	Grado de fermentación entre comparaciones de a2 vs. a0, a1 (a); y a0 vs. a1 (b).	53
Figura 7.	Grado de fermentación en función al factor tiempo de fermentación.	54
Figura 8.	Interacción de tratamientos en función de la aplicación de bacterias y tiempo de fermentación sobre las características físicas de las almendras de cacao.	54
Figura 9.	pH de las almendras de cacao entre comparaciones de a2 vs. a0, a1 (a), y a0 vs. a1 (b).	57
Figura 10.	pH de las almendras de cacao en función al factor tiempo de fermentación.	58
Figura 11.	Acidez titulable de las almendras de cacao entre comparaciones de a2 vs. a0, a1.	59
Figura 12.	Acidez titulable de las almendras de cacao en función al factor tiempo de fermentación.	60
Figura 13.	Porcentaje de teobromina de las almendras de cacao entre comparaciones de a2 vs. a0, a1 (a), y a0 vs. a1 (b).	61
Figura 14.	Acidez titulable de las almendras de cacao en función al factor tiempo de fermentación.	62

- Figura 15. Relación de teobromina/cafeína de las almendras de cacao entre comparaciones de a2 vs. a0, a1 (a), y a0 vs. a1 (b)..... 65
- Figura 16. Polifenoles (mg Ac. Gálico/g muestra desengrasada) de las almendras de cacao entre comparaciones de a2 vs. a0, a1 (a), y a0 vs. a1 (b)..... 67
- Figura 17. Concentración de polifenoles de las almendras de cacao en función al factor tiempo de fermentación. 67
- Figura 18. Área del proyecto de investigación, finca “Selva Alegre”.**¡Error! Marcador no definido.**
- Figura 19. Curado del cajón con mucilago de cacao.**¡Error! Marcador no definido.**
- Figura 20. Certificado de análisis de *Acetobacter aceti* ATCC® 15973™**¡Error! Marcador no definido.**
- Figura 21. Certificado de análisis de *Lactobacillus fermentum* ATCC® 9338™,..... **¡Error! Marcador no definido.**
- Figura 22. Inoculación de los microorganismos en cajas Petri que contienen los medios de cultivo adecuados.**¡Error! Marcador no definido.**
- Figura 23. Inoculación de los microorganismos en placas petrifilm.**¡Error! Marcador no definido.**
- Figura 24. Recuento de las UFC en las placas petrifilm.**¡Error! Marcador no definido.**
- Figura 25. Recepción de la materia prima..... **¡Error! Marcador no definido.**
- Figura 26. Pesada de las almendras de cacao (68 kg).**¡Error! Marcador no definido.**
- Figura 27. Aplicación de las bacterias en la masa fermentable.**¡Error! Marcador no definido.**
- Figura 28. Volteo de las almendras de cacao. **¡Error! Marcador no definido.**
- Figura 29. Secado de las almendras de cacao. **¡Error! Marcador no definido.**
- Figura 30. Primer día de fermentación de las almendras de cacao.**¡Error! Marcador no definido.**
- Figura 31. Quinto día de fermentación de las almendras de cacao.**¡Error! Marcador no definido.**
- Figura 32. Muestras de almendras de cacao fermentado y seco de cada tratamiento **¡Error! Marcador no definido.**
- Figura 33. Determinación de humedad de las almendras de cacao.**¡Error! Marcador no definido.**
- Figura 34. Ensayo de corte de las almendras de cacao.**¡Error! Marcador no definido.**
- Figura 35. Almendra fermentada (a) Almendra pizarrosa (b);**¡Error! Marcador no definido.**
- Figura 36. Determinación del Índice de Semilla;**¡Error! Marcador no definido.**
- Figura 37. Molido de los cotiledones (a) y tamizado con malla 42 mesh (b);**¡Error! Marcador no definido.**
- Figura 38. Determinación del pH de las almendras cacao;**¡Error! Marcador no definido.**

INDICE DE ANEXOS

- Anexo 1. Lugar de la investigación, Provincia Santo Domingo de los Tsáchilas, Cantón Santo Domingo, Parroquia San Jacinto del Búa en el Recinto “El Recreo” en la finca “Selva Alegre”; **Error! Marcador no definido.**
- Anexo 2. Construcción de los cajones, curado y cubierta para la fermentación de las almendras de cacao; **Error! Marcador no definido.**
- Anexo 3. Certificados de los microorganismos en estudio; **Error! Marcador no definido.**
- Anexo 4. Incubación de *Lactobacillus fermentum*, *Acetobacter aceti* y recuento de las UFC de bacterias en placas petrifilm; **Error! Marcador no definido.**
- Anexo 5. Manejo del beneficio de la materia prima en estudio; **Error! Marcador no definido.**
- Anexo 6. Toma de datos temperatura y humedad ambiental y temperatura de la masa de cacao en fermentación (08h00, 12h00 y 16h00) **Error! Marcador no definido.**
- Anexo 7. Muestreo Cacao en grano según la Norma Técnica Ecuatoriana NTE 177..... **Error! Marcador no definido.**
- Anexo 8. Análisis de las características físicas de las almendras de cacao **Error! Marcador no definido.**
- Anexo 9. Análisis de las características químicas de las almendras de cacao **Error! Marcador no definido.**
- Anexo 10. Resultados de los análisis de las almendras de cacao obtenidos en los laboratorios de la Universidad de las Fuerzas Armadas - ESPE, Carrera de Ingeniería Agropecuaria Santo Domingo.; **Error! Marcador no definido.**
- Anexo 11. Resultados de los análisis químicos de las almendras de cacao obtenidos en los laboratorios de la Estación Experimental Santa Catalina del INIAP..... **Error! Marcador no definido.**
- Anexo 12. Prueba de tukey al 5 % de las variables de la investigación.; **Error! Marcador no definido.**

RESUMEN

La evaluación de la aplicación de microorganismos, en la fermentación del cacao CCN-51 y su efecto en la calidad de almendras, realizada en el Cantón Santo Domingo, Parroquia San Jacinto del Búa (X:0690310; Y:9978876), a 356 msnm., temperatura 24,5 °C, HR 87 %. Se estudió el efecto de *Lactobacillus fermentum* y *Acetobacter aceti*, en la fermentación de cacao, donde se determinó tiempos óptimos para la fermentación, la calidad física y química de las almendras luego del beneficio. Estudios demuestran que la fermentación del cacao es un proceso complejo, implica acciones de bacterias ácido lácticas y ácido acéticas esenciales en la obtención de cacao de calidad. Se realizó tres aplicaciones de bacterias a la masa fermentable: se aplicó *Lactobacillus fermentum*, *Acetobacter aceti* y *Lactobacillus fermentum* más *Acetobacter aceti*, con diferentes tiempos de fermentación 72, 96 y 120 horas. Tuvo un diseño de bloques completamente al azar en esquema bifactorial con tres repeticiones. Los datos se analizaron con ADEVA, y prueba de Tukey al 5 %. La fase de campo fue en el laboratorio de la ESPE-IASA II, donde se analizaron variables de: pH, porcentaje de almendras fermentadas, violetas y pizarrosas (prueba de corte) y el INIAP determinó: porcentaje de grasa, acidez titulable (NaOH 0,01N/g), polifenoles (fotometría 760 nm) y teobromina-cafeína (HPLC). El volumen por unidad experimental fue 0,125 m³. Aplicando *Lactobacillus fermentum* más *Acetobacter aceti* en tres días de fermentación aumenta el porcentaje de almendras fermentadas y disminuyen almendras violetas y pizarrosas. Las variables químicas, mostraron que aplicando estos microorganismos, mejoran las características químicas, permitiendo a las almendras ubicarse en el rango de cacaos finos.

PALABRAS CLAVE:

- **FERMENTACIÓN CACAO CCN-51**
- **CALIDAD FÍSICA DEL CACAO**
- **CALIDAD QUÍMICA DEL CACAO**
- **LACTOBACILLUS**
- **ACETOBACTER**

ABSTRACT

The evaluation of the application of microorganisms in the fermentation of cacao CCN-51 and its effect on the quality of beans, performed in Santo Domingo city, San Jacinto del Búa parish (X:0690310; Y:9978876), 356 msnm., temperature 24,5 °C, RH 87 %. The effect of *Lactobacillus fermentum* and *Acetobacter aceti* the physical and chemical quality of the beans after the benefit was studied in the fermentation of cacao, where optimal for fermentation times were determined. Studies show that the fermentation of cacao is a complex process, involving shares of lactic acid and acetic acid bacteria essential in obtaining quality cocoa. Three applications of the fermentable mass bacteria were performed: *Lactobacillus fermentum*, *Acetobacter aceti* and *Lactobacillus fermentum* more *Acetobacter aceti* was applied with different fermentation times 72, 96 and 120 hours. Design was a randomized complete block in bifactorial scheme with three replications. Data were analyzed with ANOVA and Tukey test at 5 %. The field phase was in the laboratory of the ESPE - IASA II, where variables were analyzed: pH, percentage of fermented, purple and slate beans (test cutting); and INIAP determined: percentage of fat, titratable acidity (NaOH 0,01N/g), polyphenols (photometry 760 nm), and theobromine-caffeine (HPLC). The experimental unit volume was 0,125 m³. Applying *Lactobacillus fermentum* more *Acetobacter aceti*, three days of fermentation increase the percentage of fermented beans and beans decreased violet and slate. Chemical variables showed that applying these microorganisms improves chemical characteristics, allowing beans located in the range of fine cocoa.

KEYWORDS:

- **FERMENTATION COCOA CCN-51**
- **PHYSICAL QUALITY COCOA**
- **CHEMICAL QUALITY COCOA**
- **LACTOBACILLUS**
- **ACETOBACTER**

“EVALUACIÓN DE LA APLICACIÓN DE *Lactobacillus fermentum* Y
Acetobacter aceti, EN LA FERMENTACIÓN DEL CACAO CCN-51 Y SU
EFECTO EN LA CALIDAD DE LAS ALMENDRAS”

I. INTRODUCCIÓN

Ecuador es el quinto mayor productor de cacao del mundo, antecedido por Costa de Marfil, Ghana, Indonesia y Nigeria (ICCO, 2015), sin embargo Ecuador es el principal productor y exportador de cacao fino y de aroma, aporta con el 75% de la producción total de la Organización Internacional del Cacao (ICCO, 2013).

En el 2014 el cultivo de cacao asume gran importancia en la economía del Ecuador, ocupó el tercer lugar de las exportaciones no petroleras tradicionales (BCE, 2015). Las exportaciones de granos de cacao superaron las 236 000 TM, lo que significó 775 millones dólares; fuentes de la industria estiman que, Arriba Superior Época (ASE) representa el 37% de la producción, seguido de Colección Castro Naranjal (CCN-51) con un 36%, Arriba Superior Selecto (ASS) con un 20% y Arriba Selecto Superior de Verano (ASSS) con un 7% (Vega & Beillard, 2015).

Se estima que este cultivo da trabajo a 500 mil personas o 100 mil familias del País, que representan el 12,5 % de la PEA agrícola (Luna, 2013), la superficie total plantada en el 2014 llegó a 530 000 hectáreas, de las cuales se cosecharon 420 000 hectáreas con un rendimiento promedio de 0,57 TM/hectárea (SINAGAP, 2015).

El cacao se desarrolla asociado a otros productos como el maíz, el plátano, los cítricos o la yuca, aportando eficazmente a la fijación de carbono y contribuyendo a mejorar el medio ambiente; también es hábitat para pájaros, mariposas, ardillas, e insectos (Villacís, Tobar, & Jaramillo, 2013).

El cacao CCN-51, se caracteriza por su precocidad, resistencia a enfermarse, mazorcas grandes y necesita poco apuntalamiento (Luna, 2013), la desventaja de esta variedad, es que no se deleita con sabor arriba del cacao Nacional, se caracteriza por

notas altas de astringencia y acidez (Díaz & Pinoargote, 2012). Requiere de un proceso de post-cosecha especial para aprovechar al máximo sus cualidades de aroma y sabor, con un buen proceso de fermentado pudiendo llegar a tener sabores y aromas de calidad (Carrión, 2012).

Las almendras de cacao crudos tienen una astringencia, aroma y sabor desagradable y deben ser curados antes de procesarlos en chocolate. Los procesos de fermentación son la base de todo proceso de fabricación de chocolate y determinan el sabor de chocolate y otros productos a base de cacao (Baker, Tomlins, & Gray, 1994, Schwan & Wheals, 2004, Thompson, Miller, & Lopez, 2007, Tomlins, Baker, Daplyn, & Adomako, 1993, Wood & Lass, 2001), citado por (Lefeber, Janssens, Camu, & De Vuyst, 2010).

La fermentación del cacao es un proceso complejo que implica microbiológicamente las acciones de las levaduras, y las actividades de las bacterias ácido lácticas (BAL) y bacterias ácido acético (BAA) que son esenciales para la producción de cacao de alta calidad (Ardhana & Fleet, 2003, Ostovar & Keeney, 1973, Schwan & Wheals, 2004), citado por (Camu, y otros, 2007).

La fermentación del cacao es una etapa muy importante en el procesamiento de las almendras (Contreras, Ortiz de Bertorelli, Graziani de Fariñas, & Parra, 2002), ya que este inicia cambios bioquímicos, llevando a la formación de moléculas precursoras para el desarrollo de un sabor y color característico de las almendras (Hansen, Del Olmo, & Burri, 1998, Thompson, Miller, & Lopez, 2001), citado por (Camu, y otros, 2007), lo que determina su calidad física y química (Manual de Productos Básicos, 1991).

La presente investigación tiene como objetivo evaluar el efecto de la aplicación de *Lactobacillus fermentum* y *Acetobacter aceti*, en la fermentación del cacao CCN-51 y su efecto en la calidad de las almendras. Para ello, se plantearon los siguientes objetivos específicos: Estudiar el efecto de *Lactobacillus fermentum* y *Acetobacter aceti*, en la fermentación de cacao CCN-51; determinar el tiempo adecuado para la

fermentación de cacao CCN-51; y determinar la calidad física y química de las almendras de cacao luego del proceso de beneficio.

II. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1. HISTORIA DEL CACAO

El cacao es originario de los trópicos húmedos de América del Sur, su centro de origen parece estar situado en el noroeste de América del Sur, en la zona alta amazónica, entre Perú, Ecuador y Colombia (Enríquez, 2010). Las semillas de *Theobroma cacao* L. se han empleado a lo largo de la historia para la preparación de bebidas y otros alimentos, como moneda, bebida ceremonial y tributo a reyes (ICCO, 2003). En la actualidad sus almendras constituyen el insumo básico para la industria del chocolate y sus derivados, la industria farmacéutica y la industria cosmética (García, 2000). Por otra parte, el consumo de chocolate es asociado con una serie de beneficios para la salud; estudios demuestran que favorece al sistema circulatorio y tiene propiedades anticancerígenas, estimulador cerebral, antitumorigénico, antidiarreico y efectos afrodisíacos (BCE, 2013).

2.2. EL CULTIVO DE CACAO EN EL ECUADOR

El cacao es uno de los más significativos símbolos del Ecuador, es el producto de exportación más antiguo del País, produce y exporta cacao en grano durante todo el año en las siguientes variedades: Nacional denominado “Arriba” y CCN-51 (PROECUADOR, 2011). Desde la época de la independencia del Ecuador, ya existían muchas familias adineradas dedicadas a la producción de cacao, en haciendas denominadas “Grandes Cacaos”, la mayoría ubicadas en Vinces y otros cantones de Los Ríos (PROECUADOR, 2013).

La superficie de cacao en el Ecuador está distribuida a lo largo de 21 provincias, de acuerdo con el Instituto Nacional de Estadística y Censos (INEC, 2013), la superficie plantada de cacao fue de 508 885 has, de este total, el 75,71% posee de la costa, el 15,25% de la sierra y el 9,04% del oriente. En la costa Guayas tiene la

mayor superficie plantada de cacao con el 21,39%, le sigue Los Ríos con 20,72% y Manabí con el 19,22%. En la sierra la provincia de mayor superficie plantada de cacao es Santo Domingo de los Tsáchilas con el 4,78%, mientras que en el oriente destaca la subregión Nororiental (Sucumbíos, Orellana y Napo) 7,95%.

2.2.1. EL Cultivo Cacao en Santo Domingo de los Tsáchilas

Se estima que en la provincia de Santo Domingo de los Tsáchilas existen cerca de 25 mil hectáreas de cacao entre CCN-51 y Nacional (INEC, 2013). Las zonas de mayor producción de la Provincia son las parroquias de Valle Hermoso, Puerto Limón, Luz de América y San Jacinto del Búa, aunque en general se observan cultivos en toda la provincia con menores potenciales productivos (Campos, 2011).

Según (Jácome, 2010), en la provincia se ha introducido clones de cacao, uno de ellos es el cacao CCN-51, llegando a producir de 40 a 45 quintales por hectárea cada año con una densidad de 800 a 900 plantas por hectárea; es por esto que los productores han visto la necesidad de crear asociaciones según su lugar de producción. (Campos, 2011), menciona que cerca del 80% son pequeños, un 18% son medianos y apenas el 2% son considerados como grandes productores.

2.3. CLASIFICACIÓN GENÉTICA DEL CACAO

En la clasificación antigua de los tipos de cacao se identifican tres grupos: el cacao Criollo, el cacao Forastero y el cacao Trinitario (Villacís, Tobar, & Jaramillo, 2013); pero, mediante marcadores bioquímicos y moleculares, se ha confirmado la naturaleza híbrida del grupo Trinitario (Criollo x Forastero) (N' Goran, y otros, 1994), citado por (García, 2008). Asimismo, al final de otro estudio molecular, se concluyó que el cacao Nacional es genéticamente diferente del Forastero, Criollo y Trinitario (Loor, 2007), citado por (Amores, Palacios, Jiménez, & Zhang, 2009).

2.3.1. Cacao Criollo

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

2.3.2. Cacao Forastero

Crecen al estado silvestre y domesticado en la Amazonía Alta (Perú, Ecuador y Colombia), en la Amazonia Baja (Brasil, Surinam, Guyana Francesa), y a lo largo del Orinoco (Venezuela) (Garcia, 2008); además, se incluyen los que se cultivan en el oeste africano, así como otros cultivares encontrados en diferentes países de América Central y norte de América del Sur (Enríquez, 2004). Las almendras son aplanadas o intermedias con cotiledones de color morado, sus almendras producen un chocolate con sabor y aroma corriente; este tipo de cacao requiere de cinco a siete días para completar su fermentación (Garcia, 2008).

2.3.3. Cacao Trinitario

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

Dentro de estos materiales se encuentra el clon CCN51, que es producto de la investigación realizada en Ecuador en la zona de Naranjal, por el agrónomo Homero Castro por el año de 1965, este clon presenta características de alta producción y tolerancia a las enfermedades pero no tiene el aroma que posee el Nacional (Enríquez, 2010).

2.3.3.1. Cacao variedad CCN-51

El CCN-51 es un cacao clonado de origen ecuatoriano, es así que el 22 de junio del 2005 fue declarado mediante acuerdo ministerial, un producto de alta productividad. Con esta declaratoria, el Ministerio de Agricultura brinda apoyo para fomentar la producción de este cacao, así como su comercialización y exportación (BCE, 2013). Actualmente a este cacao se lo conoce por el nombre de Don Homero CCN-51, es un cacao genéticamente fino y de alta calidad que produce un promedio de 3 toneladas de cacao en grano seco por hectárea (APROCAFA, 2010), citado por (Bustamante & Ramírez, 2010).

Es importante señalar que el origen genético de este clon es fruto del cruzamiento entre IMC-67 (Amazónico) x ICS-95 (Trinitario), y la descendencia de estos fue cruzada con otro cacao del oriente que el agrónomo Castro lo colectó y denominó Canelos por el lugar de origen; por tanto, el CCN-51 corresponde a lo que se conoce como un híbrido doble; lo que hay que resaltar es que solamente la planta número 51 fue la que se destacó por sus excelentes características agronómicas y sanitarias, motivo por el cual fue clonada en forma masiva (De Cebra, 2004).

Las principales características del cacao CCN-51 son las siguientes: en primer lugar se destaca su altísima productividad que llega en muchas haciendas a superar los 50 quintales por hectárea lo que lo convierte en un cultivo rentable para el agricultor carente hoy en día de alternativas seguras. Es un clon auto compatible, es decir no necesita de polinización cruzada para su fructificación, se caracteriza por ser un cultivar precoz pues inicia su producción a los 24 meses de edad y es tolerante a la enfermedad Escoba de Bruja (*Moniliophthora perniciosa* Stahel), enfermedad que ataca a la mayoría de variedades de cacao destruyendo gran parte de su producción (Cedeño, 2004), citado por (Bustamante & Ramírez, 2010).

Además, es una planta de crecimiento erecto pero de baja altura lo que facilita y abarata las labores agronómicas tales como poda y cosecha entre otras; posee excelente índice de mazorca (IM) 7 mazorcas/libra de cacao seco, excelente índice de

semilla: 1,45 g/semilla seca y fermentada comparado con el índice promedio de 1,2 g/semilla seca, alto índice de semillas por mazorca: que es de 45, mucho más alto que el promedio normal de 36 semillas por mazorca; es un clon cosmopolita que se adapta a casi todas las zonas tropicales desde el nivel del mar hasta los 1 000 msnm.; tiene alto porcentaje de manteca (54%) lo que lo hace muy cotizado por las industrias (Cedeño, 2004), citado por (Bustamante & Ramírez, 2010).

2.3.4. Cacao Nacional

Es el único grupo natural de cacao que se cultiva en el occidente de Ecuador; las almendras son grandes y de color morado pálido u oscuro o marrón; las semillas se fermentan de cuatro a cinco días y tienen un intenso aroma floral (García, 2008). Según (Enríquez, 2010), la mayoría de los materiales plantados en el Ecuador corresponden a un genotipo de Nacional x Trinitario, en menor grado un tipo de Nacional x Alto Amazonas; la cantidad de cacao tipo “Nacional” puro, es cada día menor.

2.4. REQUERIMIENTOS AGROCLIMÁTICOS

Entre los factores ecológicos de mayor importancia para el cultivo de cacao, la temperatura y las lluvias son considerados como factores climáticos críticos para su desarrollo, por lo tanto pueden restringir las zonas para su cultivo (Enríquez, 2010). (AGROCALIDAD, 2012) Menciona otros factores agroambientales a tener en cuenta para el cultivo y se describen a continuación:

Temperatura	:	24 – 26 °C
Altitud	:	0 – 1 000 msnm
Precipitación	:	1 500 – 2 000 mm/año
Humedad	:	70 – 85 %
Viento	:	Max. 5 m/segundo
Suelo	:	Profundo 0,8 – 1,5 m
Textura	:	Francos, francos-limosa, franco-arcillosa

Topografía	:	Planos hasta 30 % pendiente
Materia orgánica	:	3 – 5 %
pH	:	6,0 – 7,0

2.5. BENEFICIO DEL CACAO

El beneficio es la manera de preparar el cacao como materia prima para industrialización del producto, utilizando una serie de operaciones ordenadas (Vera, 1993) la que se inicia con la cosecha de mazorcas, fermentación, secado, limpieza y selección, y concluye con el almacenamiento del grano (Pérez, 2009).

2.5.1. Cosecha de Mazorca

La cosecha consiste en la tumba, corte y recolección de mazorcas maduras del árbol (AGROCALIDAD, 2012), la coloración particular de las mazorcas del clon CCN-51 son de color rojizo o rojo a naranja amarilleado (APROCAFA, 2007), citado por (Bustamante & Ramírez, 2010). Simultáneamente al corte y tumba de las mazorcas, se debe ir eliminando aquellas dañadas por roedores, insectos, y las que están afectadas por escoba de bruja (*Moniliophthora perniciosa* Stahel), por monilla (*Moniliophthora roreri* (Cif y Par) Evans *et al.*) y otras enfermedades (AGROCALIDAD, 2012).

La recolección se la debe hacer dependiendo de los picos de la producción, cada ocho días en temporada de máxima producción y cada 15 o 20 días cuando disminuye la producción de mazorcas; asimismo, el sitio donde se recolectan y se parten las mazorcas deben ser de preferencia dentro de la misma huerta, procurando diseminar equitativamente los pilos (AGROCALIDAD, 2012); ya que, las cascaras de las mazorcas cosechadas que quedan en el campo aportan como hospederos del insecto polinizador *Forcipomyia sp.* y fertilizante orgánico (APROCAFA, 2007), citado por (Bustamante & Ramírez, 2010).

Durante el corte se debe procurar que las almendras no tengan ningún daño, pues sería la vía de ingreso de insectos y enfermedades. Una vez retiradas las almendras

de la mazorca, se desprende la placenta (maguey), deben ser colocadas y transportadas en sacos de yute o cabuya limpios y destinados únicamente para esta labor (AGROCALIDAD, 2012).

2.5.2. Fermentación

La fermentación aporta a los alimentos interesantes beneficios así por ejemplo: mejorando la calidad sensorial y las características organolépticas en general, al modificar la textura y el aroma de los mismos (Bourgeois & Larpent, 1989, Giraffa, 2004), citado por (Seseña, 2005).

(Wacher, 2011) Menciona que el proceso de fermentación del cacao es natural o espontaneo, ya que no se añaden intencionalmente los microorganismos a los granos, que de hecho se encuentran estériles dentro de las vainas, se contaminan con microorganismos provenientes de todas las superficies con las que entran en contacto: los utensilios y las manos de las personas que manipulan el cacao.

2.5.2.1. Sucesión de poblaciones de microorganismos durante el proceso de fermentación

En la primera fase aparecen diferentes especies de levaduras, estos microorganismos llevan a cabo la fermentación en la pulpa, que contiene carbohidratos (glucosa, fructosa, sacarosa) y un valor de acidez (pH) entre 3,3 y 4,0, debido a la presencia de ácido cítrico; la pulpa es viscosa porque contiene pectina y otros polisacáridos, que además dificultan la difusión del aire, en esas condiciones se favorece el desarrollo de levaduras (Wacher, 2011).

Las levaduras llevan a cabo el proceso de fermentación, transformando los azúcares sencillos del mucílago en etanol, degradando la pectina, lo que modifica la textura del grano y elimina el ácido cítrico, lo que trae como consecuencia una disminución de la acidez; por otro lado, el consorcio de levaduras consume el oxígeno, creando un ambiente anaerobio que favorece el desarrollo de bacterias lácticas (Wacher, 2011).

En la segunda fase del proceso de fermentación del cacao, se favorece el desarrollo de bacterias lácticas, que fermentan los carbohidratos residuales y continúan el consumo del ácido cítrico; asimismo, las levaduras contienen enzimas del tipo “pectinolítico”, lo que les permite hidrolizar las pectinas, ocasionando una disminución de la viscosidad del mucílago y favoreciendo la entrada de aire, con este ambiente aerobio y menos ácido (debido al consumo de ácido cítrico) se favorece el desarrollo de bacterias acéticas (Wacher, 2011), la bacteria *Acetobacter aceti* es inoculada por insectos del género *Drosophila* (Sandoval, 2009).

En la tercera fase del proceso de fermentación ocurre un cambio importante en términos de los productos de la fermentación, ya que intervienen bacterias acéticas que llevan a cabo la transformación del etanol que produjeron las levaduras en ácido acético, dado que la transformación de etanol en ácido acético es una reacción exotérmica, se produce calor; el etanol y el ácido acético se difunden hacia el interior de los granos y junto con la temperatura alta, matan al embrión (Wacher, 2011), es así como el final de la fermentación. Simultáneamente, este inicia los cambios bioquímicos en los granos, lo que lleva a la formación de moléculas precursoras para el desarrollo de un sabor y color característico de los granos (Hansen, Del Olmo, & Burri, 1998, Thompson, Miller, & Lopez, 2001), citado por (Camu, y otros, 2007).

2.5.2.2. Bacterias del ácido láctico (BAL)

Son bacterias ácido lácteas y se ubican en la familia *Lactobacillaceae*, son bacterias Gram-positivas, son microorganismos anaerobios y estrictamente fermentativos; los carbohidratos les resultan indispensables para su buen desarrollo, pues los fermentan para dar lugar al ácido láctico, alcohol y dióxido de carbono como subproductos; estos microorganismos no desarrollan olores típicos al crecer en medios comunes, pero contribuyen a modificar el sabor de alimentos fermentados, produciendo compuestos volátiles (Andrade, 2013).

En las fermentaciones tradicionales del cacao ecuatoriano (montones y cajas), se han aislado bacterias ácido lácticas y los principales representantes fueron

Leuconostoc pseudomesenteroides (fermenta glucosa y fructosa), *Fructobacillus tropaeoli*-like (fermenta fructosa) y *Lactobacillus fermentum* (convierte citrato y produce manitol), en las fermentaciones naturales se encontraron densidades de población de las BAL de $8,5 \pm 0,5 \log$ UFCg-1 (Papalexandratou, y otros, 2011).

Las cepas específicas del cacao son las *Lactobacillus fermentum* ya que están mejores adaptadas al ecosistema de la pulpa de cacao, ellas fermentan glucosa a ácido láctico y ácido acético, reducen fructosa a manitol, y convierten ácido cítrico en ácido láctico y 2,3-butanodiol (Lefeber, Janssens, Moens, Gobert, & De Vuyst, 2011). Las bacterias *Lactobacillus fermentum* posee características de ser pequeños, tienen bordes enteros, son convexos, su color es gris claro, son lisos, brillantes, y translúcidos; además, son Gram positivos y en su mayoría están individualmente o en pares (Microbiologics, 2015).

(Lefeber, Janssens, Moens, Gobert, & De Vuyst, 2011) Demostraron en un estudio que la pulpa de cacao en realidad es un substrato ideal para especies estrictamente heterofermentativas (*Lactobacillus fermentum*), porque contiene una alta concentración de fructosa (fuente de energía y/o alternativa externa de aceptor de electrones) y ácido cítrico (fuente adicional del piruvato). El *Lactobacillus fermentum* ATCC® 9338™ tiene un crecimiento satisfactorio en M.R.S. broth (Laboratorios Britania, 2010), el mismo laboratorio menciona que el crecimiento microbiano se evidencia por la presencia de turbidez.

Las especies de bacterias ácido lácticas son importantes para el éxito de una sucesión microbiana durante las fermentaciones de granos de cacao; en realidad, las BAL forman el enlace entre el etanol producido por la fermentación de las levaduras y el ácido acético producido por la fermentación del BAA (De Vuyst, Lefeber, Papalexandratou, & Camu, 2010, Lefeber, Janssens, Camu, & De Vuyst, 2010), citado por (Lefeber, Janssens, Moens, Gobert, & De Vuyst, 2011).

El ácido láctico y manitol producidos podrían servir como fuentes de energía adicionales para las especies BAA, mientras que la conversión de ácido cítrico

resulta en un aumento en el pH y una posible contribución al aroma de cacao; así, las cepas de BAL, ya sea como monocultivo o co-cultivo, serán componentes esenciales de cultivos iniciadores dirigidos al control de los procesos de fermentación de granos de cacao para obtener granos de cacao secos bien fermentados y mejores estándares de degustación de chocolates producidos de los mismos (Lefeber, Janssens, Moens, Gobert, & De Vuyst, 2011).

2.5.2.3. Caldo de cultivo M.R.S. broth

El caldo de cultivo M.R.S. broth fue desarrollado por Man, Rogosa y Sharpe, y por su formulación permite el adecuado desarrollo de *Lactobacillus* y otras bacterias ácido lácticas; la proteosa peptona, el extracto de carne, el extracto de levadura y la glucosa constituyen la fuente nutritiva ya que aportan nitrógeno, carbono, vitaminas y minerales; el monoleato de sorbitán, las sales de: sodio, magnesio y manganeso proveen cofactores para el crecimiento bacteriano y pueden inhibir el desarrollo de algunos microorganismos; el citrato de amonio actúa como agente inhibitorio del crecimiento de bacterias Gram negativas; el medio de cultivo deshidratado es de color beige, homogéneo, no presenta libre deslizamiento; mientras que el medio de cultivo preparado es de color ámbar oscuro (Laboratorios Britania, 2010), el mismo laboratorio indica la composición del M.R.S. broth para bacterias ácido lácticas para un litro de agua destilada:

Proteosa peptona N° 3	:	10,00 g
Extracto de carne	:	10,00 g
Extracto de levadura	:	5,00 g
Glucosa	:	20,00 g
Monoleato de sorbitán	:	1,00 mL
Fosfato dipotásico	:	2,00 g
Acetato de sodio	:	5,00 g
Citrato de amonio	:	2,00 g
Sulfato de magnesio	:	0,20 g
Sulfato de manganeso	:	0,05 g
pH final	:	6,50 ± 0,20

2.5.2.4. Bacterias del ácido acético (BAA)

Son bacterias ácido acéticas y se ubican en la familia *Acetobacteraceae*, son bacterias Gram-negativa, bacterias aeróbicas obligadas que se han generalizado en la naturaleza (Cleenwerck, y otros, 2002, Loganathan & Nair, 2004, Jojima, y otros, 2004, Yukphan, y otros, 2005, Greenberg, y otros, 2006), citado por (Cleenwerck, y otros, 2007). Una característica común de BAA (con la excepción del género *Asaia*) es la capacidad para oxidar etanol a ácido acético bajo condiciones de pH neutral y ácido (pH 4,5). Debido a esta característica, BAA están a menudo involucrados en la producción de alimentos fermentados, ya sea de formas beneficiosas (productos de chocolate, café, vinagre, crema de coco y cervezas especiales) o perjudiciales (deterioro de cervezas, vinos y sidras) (Kersters, y otros, 2006), citado por (Cleenwerck, y otros, 2007).

BAA contribuye al desarrollo del cacao de alta calidad ya que juegan un papel crítico en la fermentación espontánea de los granos de cacao, considerado como el primer paso en la producción de chocolate (Schwan & Wheals, 2004), citado por (Cleenwerck, y otros, 2007). El *Acetobacter aceti* ATCC® 15973™ tiene un crecimiento satisfactorio en G.Y.C. broth (Laboratorios Conda, 2010).

Las bacterias acéticas más importantes que se han aislado de la fermentación del cacao son: *Gluconobacter oxydans*, *Acetobacter aceti* y *Acetobacter pasteurianus* (Nielsen, y otros, 2007), citado por (Wacher, 2011). En las fermentaciones tradicionales del cacao ecuatoriano (montones y cajas), se han aislado bacterias ácido acéticas y cuyo principal representante fue *Acetobacter pasteurianus* que generalmente aparecieron después de la fermentación y oxida etanol en ácido acético, en las fermentaciones naturales se encontraron densidades de población de las BAA de $8,0 \pm 0,5 \log$ UFCg-1 (Papalexandratou, y otros, 2011).

El *Acetobacter aceti* posee características de ser pequeños, redondos, convexos, tienen borde entero, su color es blanco pálido a translúcido; las colonias se hacen más grandes, planas y ásperas; además, son Gram negativas, pleomórficas, en su

mayoría están individualmente, en pares o en cadenas, son de forma elipsoidal, hinchadas, curvos y se pueden observar de forma filamentosa (Microbiologics, 2015).

2.5.2.5. Caldo de cultivo G.Y.A. broth

El caldo de cultivo G.Y.C. broth descrito por Swings, detecta la presencia de microorganismos productores de ácido y es considerado como “medio de crecimiento estándar” para las bacterias del ácido acético; la dextrosa es el hidrato de carbono fermentable proporciona carbono y energía; el extracto de levadura es fuente de vitaminas, en particular el grupo B; en este medio, las bacterias del genero *Acetobacter* produce zonas claras o halos alrededor de las colonias debido a que el ácido que se produce va a neutralizar el CaCO_3 , a diferencia de las bacterias lácticas, las bacterias del ácido acético son aerobios obligados y por lo que es necesario el uso de placas separadas (Laboratorios Conda, 2010), el mismo laboratorio indica la composición del G.Y.C. broth para bacterias ácido acéticas para un litro de agua destilada:

Dextrosa	:	50,00 g/l
Extracto de levadura	:	10,00 g/l
CaCO_3	:	5,00 g/l
pH final	:	5,90 \pm 0,40

2.5.2.6. Métodos de fermentación

En el Ecuador los principales métodos utilizados son los cajones de madera, montón y sacos (AGROCALIDAD, 2012).

1) Fermentación en montón

Este método es el más sencillo y el más utilizado actualmente por los pequeños productores, así las almendras después de haber sido recolectadas y extraídas de la

mazorca, se colocan en montones sobre una superficie que posea pendiente o un sistema de drenaje simple; como por ejemplo un piso de madera (Benitez, 2001).

2) Fermentación en sacos

El agricultor usa esta metodología de manera general; ya que es sencilla y permite el almacenamiento de las almendras de cacao. Este proceso consiste en colocar en sacos de yute o plástico las almendras sacadas de la mazorca, y así permitir el fluido normal de los líquidos de las almendras recién cosechadas (Rivadeneria, 2013).

3) Fermentación en cajas

La madera más aconsejable para elaborar los cajones de fermentación es el laurel (*Cordia alliodora* (Ruiz & Pav.) Oken), nunca se debe usar maderas que puedan contaminar, transmitir olores y/o resinas al grano, las dimensiones de los cajones deberían estar acordes a los volúmenes de producción de la huerta; en los cajones no deben existir clavos u otros materiales de metal; los cajones deben estar bajo cobertura colocados en lugares frescos y secos, su disposición puede ser individual o tipo escaleras (AGROCALIDAD, 2012).

El grosor de la madera debe ser mínimo de 2 cm, el piso del cajón debe tener perforaciones de 1 cm de diámetro, con una separación de 10 cm entre sí, para el escurrimiento y debe estar separado del suelo por lo menos 10 cm (AGROCALIDAD, 2012).

2.5.2.7. Temperatura de fermentación

(Saltos, 2005), considera que la fermentación es más rápida a medida que la temperatura aumenta; el embrión muere cuando las temperaturas alcanzan los 40 y 50 °C. Además, cuando la temperatura sube entre 52 y 55 °C, los microorganismos no pueden ejercer sus actividades y a los 70 °C no se reproducen (Lainez, 1959).

2.5.2.8. Frecuencia de remoción y tiempo de fermentación

Por lo general va combinado el tiempo de fermentación y el tipo de fermentador, ya que entre más grande sea la capacidad del fermentador más exigido será la remoción (Enríquez, 2003). La remoción de la masa de granos empieza una vez concluidas las 48 horas de reposo de la masa de granos, luego es necesario voltear la masa de cacao diariamente (INIAP, 2010). El tiempo de fermentación puede variar por distintos factores; clima, especie, recipientes, necesidades del agricultor, entre otros. (Arroyo, 2010). (Enríquez, 2010), menciona, para el cacao trinitario (clon CCN-51) el tiempo de fermentación es de cinco a seis días en montones o cajas.

Los indicativos de que la almendra siguió un buen proceso de fermentación es que la temperatura empieza a descender, el grano se hincha, el embrión muere, al hacerle un corte escurre un líquido color vino tinto y la almendra es de color lila pálido (AGROCALIDAD, 2012).

2.5.3. Secado

Después de la fermentación, las almendras tienen alrededor del 55% de humedad (Graziani De Fariña, Portillo, & Betancourt, 2005), que debe reducirse al 7% (cero relativo), que es el porcentaje máximo de humedad del cacao beneficiado, con el cual se debe almacenar y comercializar (NTE INEN 176, 2000).

(AGROCALIDAD, 2012) recomienda hacerlo en: tendales de caña, madera y cemento, en lugares donde por problemas de clima no se puede hacer el secado natural, y se adopte por el secado artificial, se debe controlar la temperatura del secado en $50\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 10\text{ }^{\circ}\text{C}$ para evitar que este sea muy rápido; hay que hacer constantemente remociones para asegurar un secado uniforme; por otra parte se debe cercar el sitio donde el cacao es secado para evitar el ingreso de gallinas, perros, roedores y otros animales, evitando la contaminación de los granos.

El secado fortalece el desarrollo de precursores de aroma y sabor (AGROCALIDAD, 2012), también contribuye a la disminución del amargor y la astringencia del cacao (Mossu, 2002), citado por (Amores, Palacios, Jiménez, & Zhang, 2009).

2.5.4. Limpieza y Selección

Terminado el secado es conveniente limpiar el producto de impurezas a fin de obtener un producto de mejor valor comercial (Gaibor, 2010). Los parámetros de calidad del grano del cacao exigidos por la Unión Europea, es el tamaño del grano (calibre) que es mínimo de un gramo/grano (Schwan, 2000).

2.5.5. Almacenamiento

Seguidamente del secado de los granos de cacao se debe proteger de la acción de agentes externos que alteren sus características químicas y físicas, resistir las condiciones de manejo, transporte y almacenado; de preferencia usar sacos de yute o cabuya limpios, y ubicarse a una distancia de 80 cm separado de la pared y sobre pallets (AGROCALIDAD, 2012).

Debido a la alta concentración de grasa (50 % de su peso), las almendras se contaminan por su fácil absorción de olores y sabores extraños (Bustamante & Ramírez, 2010); es por esto que el ambiente donde se va almacenar debe estar exento de olores extraños (Schwan, 2000).

2.6. CALIDAD DEL CACAO

El mercado reconoce tres componentes en la calidad del cacao, que son: físicos, químicos y organolépticos (De Cazy, Drogué, Jacques, & Deheuvél, 2000).

El cacao beneficiado, deberá sujetarse a las normas establecidas por la Organización de la Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO) y la Organización Mundial de la Salud (OMS), en cuanto tiene que ver con los límites

de recomendación de aflatoxinas, plaguicidas y metales pesados; a nivel local se aplica la (NTE INEN 176, 2000) que se describen a continuación:

El porcentaje máximo de humedad del cacao beneficiado será de 7% (cero relativo); la muestra debe estar libre de granos sin fermentar (pizarras) de color gris oscuro, o mal fermentados (violetas) y totalmente morados, dentro del porcentaje de defectuosos no deberá exceder del 1% de granos partidos; el cacao beneficiado no deberá estar infestado, debe estar libre de impurezas y libre de olores a moho, ácido butírico (podrido), agroquímicos, o cualquier otro que pueda considerarse objetable (NTE INEN 176, 2000).

Asimismo, el contenido de grasa debe ser el más alto posible, preferible sobre el 50%; el peso promedio de un grano fermentado y seco no debe ser inferior a un gramo; la cutícula o testa será suelta y entera, bastante fuerte para evitar la ruptura y su valor no debe pasar del 12 % del peso de la almendra y las almendras deben tener la capacidad de desarrollar un buen chocolate después de su beneficio (NTE INEN, 2006), citado por (Bravo & Mingo, 2011).

2.6.1. Calidad Física de las Almendras de Cacao

El componente físico de la calidad comprende el tamaño de la almendra, coloración externa e interna, grado de fermentación, peso promedio de una almendra, contenido de cascara de la misma, contenido de humedad, defectos, impurezas y materias extrañas (FUNDACITE, 2005).

Una de las pruebas más utilizadas para determinar la calidad física del cacao es la prueba de corte, ya que es una recomendación de la IOCCC (International Office of Cocoa Chocolate y Sugar Confectionary); la ventaja de esta prueba es que no se requiere de un equipo especializado, a excepción de una balanza, un cuchillo y un entrenamiento adecuado (Villavicencio, 2001). La prueba de corte es una prueba subjetiva que requiere de la observación visual y se utiliza para determinar el grado de fermentación de las almendras, por su influencia directa sobre el sabor y aroma a

chocolate (Stevenson, y otros, 1993), citado por (Amores, Palacios, Jiménez, & Zhang, 2009).

Los resultados de la prueba de corte permiten la clasificación en granos de buena fermentación, es decir cuando los cotiledones presentan en su totalidad una coloración marrón o marrón rojiza, para el tipo CCN-51 la coloración varía de marrón a marrón violeta y sus estrías de fermentación son profundas, y cuando los cotiledones están ligeramente estriados presentan un color ligeramente violeta, se consideran granos ligeramente fermentados; además, se clasifican en: granos violetas, es cuando los cotiledones presentan un color violeta intenso, y en granos pizarrosos/pastosos, es cuando un grano está sin fermentar, cuando al ser cortado longitudinalmente, presenta en su interior un color gris negruzco o verdoso y de aspecto compacto, esto se debe al mal manejo durante la fase de beneficio del grano (NTE INEN 176, 2000).

Se considera como grano defectuoso a los granos que han sufrido deterioro parcial o total en su estructura interna debido a la acción de hongos; también a los granos que han sufrido deterioro en su estructura (perforaciones, picados, etc.) debido a la acción de insectos; los granos vulnerados son los que han sufrido un deterioro evidente en su estructura por el proceso de germinación, o por la acción mecánica durante el beneficiado; los granos múltiples o pelota es cuando están unidos entre dos o más granos; los granos negros se producen por mal manejo pos-cosecha o en asociación con enfermedades; asimismo, se considera como defecto a un grano con olor o sabor a humo o que muestra signos de contaminación por humo; un grano cuyos cotiledones se han atrofiado hasta tal punto que cortando la semilla no es posible obtener una superficie del cotiledón se los considera como grano plano, vano o granza y los granos partidos son fragmentos de grano entero que tienen menos del 50% del grano entero (NTE INEN 176, 2000). A continuación en el cuadro 1 se muestran los cacaos del Ecuador por la calidad:

Cuadro 1. Tabla de requisitos de la calidad del cacao beneficiado.

Requisitos	Unidad	Cacao Arriba					CCN-51
		ASSPS	ASSS	ASS	ASN	ASE	
Cien almendras pesan	g	135-140	130-135	120-125	110-115	105-110	135-140
Buena fermentación (mínimo)	%	75	65	60	44	26	65***
Ligera fermentación* (mínimo)	%	10	10	5	10	27	11
Total fermentado (mínimo)	%	85	75	65	54	53	76
Violeta (máximo)	%	10	15	21	25	25	18
Pizarroso/pastoso (máximo)	%	4	9	12	18	18	5
Moho (máximo)	%	1	1	2	3	4	1
Totales (análisis sobre 100 almendras)	%	100	100	100	100	100	100
Defectuoso (máximo) (análisis sobre 500 gramos)	%	0	0	1	3	4**	1

ASSPS Arriba Superior Summer Plantación Selecta

ASSS Arriba Superior Summer Selecto

ASS Arriba Superior Selecto

ASN Arriba Superior Navidad

ASE Arriba Superior Época

* Coloración marrón violeta.

** Se permite la presencia de granza solamente para el tipo ASE

*** La coloración varía de marrón violeta

Fuente: (NTE INEN 176, 2000).

La comercialización internacional requiere cacaos con índice de semilla superior de 1 g/almendra, el índice promedio de semilla del cacao ecuatoriano es de 1,26 g y el de Ghana considerado el referente mundial para la calidad, particularmente física, en el mejor de los casos llega a 1,15 g, el índice de semilla es más alto al final del periodo lluvioso por las mejores condiciones para el desarrollo de las almendras. (Amores, 2009), citado por (Amores, Palacios, Jiménez, & Zhang, 2009).

El porcentaje de la testa o cascarilla posee un fuerte componente genético variando desde porcentajes de 6 al 16 % con respecto al peso total de la almendra, usualmente mantiene una relación inversamente proporcional con el tamaño de la almendra (Alvarado & Bullard, 1961), citado por (Amores, Palacios, Jiménez, & Zhang, 2009), es decir que el porcentaje es más alto en las almendras pequeñas y menor en las más grandes.

2.6.2. Composición Química de las Almendras de Cacao

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

Según (Wakao, 2002), la composición química de los granos de cacao depende de varios factores entre los que se puede citar: tipo de cacao, origen geográfico, grado de madurez, calidad de la fermentación y el secado. Los principales compuestos químicos encontrados en las almendras tienen de alguna manera influencia en las características organolépticas de amargor, astringencia y acidez del chocolate y están ligadas a la presencia de componentes químicos pertenecientes al grupo de las bases púricas (teobromina y cafeína), polifenoles y ácidos volátiles (Recalde, 2007).

2.6.2.1. Contenido de Grasa

La almendra de cacao es muy rica en materia grasa, generalmente superior al 50 % y puede alcanzar hasta el 55 % (Braudeau, 1970). La grasa está constituida principalmente por glicéridos como el ácido oleico, láurico, palmítico y esteárico (Wakao, 2002).

Uno de los más importantes factores en términos de importancia comercial es el porcentaje de grasa en la almendra, un elevado nivel de grasa podría interferir en el

proceso normal de fermentación, haciéndolo más largo (Braudeau, 1970). El tipo de cacao forastero y trinitario tienen un porcentaje de grasa variable (45 - 60 %), mientras que el cacao criollo tiene un porcentaje inferior al 54 % (García, 2008).

2.6.2.2. Potencial de Hidrógeno (pH) de las almendras de cacao

El pH es un criterio bioquímico que puede mostrar cómo transcurre la fermentación y ser un indicativo de la calidad del cacao (Saposhnikov, s/f), citado por (Vargas, 1988). Existe una correlación positiva entre el aroma y el pH; es decir, mientras más bajo sea el pH menor es el aroma, relacionando tal índice con el grado de fermentación (Ochse, s/f), citado por (Jimenez, 2000).

(Sánchez, 2007) Indica que la pulpa fresca tiene un pH de 3,4 a 4,6 en la misma etapa el pH de los cotiledones es de 6,6, el pH óptimo para un cacao de calidad debe encontrarse en un rango de 5,1 a 5,4 después del secado, cualquier cacao con pH menor a 5,0 indica presencia de ácidos volátiles indeseables que dan al producto aromas desagradables, que perjudican a la producción del chocolate. (Amores, Palacios, Jiménez, & Zhang, 2009) Mencionan que se deben tomar las precauciones necesarias para evitar la acidez excesiva del cacao fermentado y seco, pues es un defecto que disminuye la calidad sensorial.

(Enríquez, 1995) Menciona que el cacao fino y de aroma tiene un pH más bajo que el cacao ordinario o forastero; la presencia más rápida del ácido acético en el proceso de fermentación del cacao de clase fina lleva a una muerte del embrión más rápida, acortando por consiguiente todo el proceso de fermentación. (Jinap & Dimick, 1990), citado por (Villavicencio, 2001) indican que el grupo de cacaos clasificados en su trabajo como de bajo pH, contiene altos niveles de ácido láctico y acético, mientras que en el caso del grupo con alto pH, las concentraciones de estos ácidos es menor, esto permite determinar que la difusión de los ácidos orgánicos, principalmente el ácido acético, hacia el cotiledón influye principalmente sobre el pH de una muestra.

2.6.2.3. Ácidos orgánicos

En el cacao los ácidos orgánicos juegan un papel muy impórtate dentro de la formación de los componentes responsables del aroma dentro del cacao; además de producir la muerte del embrión y evitar la germinación, estos ácidos mediante una serie de cambios bioquímicos, producen reacciones de formación de los precursores de aroma de chocolate (Armijos, 2002).

Los ácidos en las almendra de cacao pueden ser divididos en volátiles y no volátiles: los ácidos volátiles son el acético, propiónico, butírico, isobutírico e isovaleriánico y los ácidos no volátiles se incluye al acido oxálico, cítrico, málico, succínico, láctico y tartárico (Jinap, 1994), citado por (Recalde, 2007). Algunos, entre ellos como el acético, cítrico y oxálico, se forman durante la fermentación y son los que dan el sabor a cacao; los ácidos orgánicos de mayor contenido en el cacao son el acético como representante de los volátiles y de los no volátiles el cítrico (Armijos, 2002).

2.3.1.1. Concentración de polifenoles

Los compuestos fenólicos desempeñan un papel muy importante en los aspectos de calidad del cacao, especialmente en las características sensoriales: aroma, color y astringencia (Calderón, 2002). Es importante saber que el nivel de los polifenoles variara con las diferentes variedades de cacao y con el grado de fermentación de las almendras (Food-info.net s/f), citado por (Recalde, 2007).

Los polifenoles de las almendras de cacao, están almacenadas en grupos de células distribuidas en los cotiledones y son compuestos que participan activamente en las modificaciones bioquímicas en el interior de las almendras durante la fermentación (Calderón, 2002). Como resultado disminuye astringencia y amargor (Cros, 2004), influyendo positivamente sobre la calidad sensorial del cacao.

En las almendras violetas este fenómeno es incompleto, por lo que la intensidad de amargor y astringencia se encuentra asociada a una mayor concentración final de

polifenoles totales; si la fermentación es bien llevada, la concentración de polifenoles totales en los granos de cacao, se reduce en un 40 % o más (Calderón, 2002).

2.6.2.5. Teobromina y Cafeína

La teobromina y la cafeína pertenecen a la familia de las purinas y representan más del 99 % de los alcaloides presentes en el cacao, la concentración final de ambos está determinada por: el genotipo, el grado de maduración de las almendras y el nivel de fermentación (Wakao, 2002). Durante la fermentación, el contenido de teobromina y cafeína se reduce entre el 20 y 30 %, contribuyendo en el descenso en el nivel de amargor de las almendras al reducirse el aporte de la teobromina en la expresión de este rango sensorial (Amores, Palacios, Jiménez, & Zhang, 2009).

Según (Braudeau, 1970), el sabor amargo del cacao está influenciado en gran parte por el contenido de las purinas (teobromina y cafeína) y en menor grado por los compuestos fenólicos. Por otra parte, un estudio conducido por (Hasing, 2004), con muestras de cacao que corresponden a diferentes grupos de cacao presento valores de la relación Teobromina/Cafeína para diferenciar los grupos genéticos de cacao Forastero, Trinitario y Criollo.

Cuadro 2. Valores de la relación Teobromina/Cafeína para diferentes grupos genéticos de cacao.

Grupos	Valor de Relación Teobromina/Cafeína
Cacao Forastero	15-10
Cacao Trinitario	10-5
Cacao Criollo	2-1

Fuente: (Hasing, 2004).

2.6.3. Calidad Organoléptica de las Almendras de Cacao

Un punto dominante en la calificación del cacao de exportación se basa en la características organolépticas (sabor y aroma), tales como el amargor y la astringencia, que están intrínsecas en las almendras de cacao, requisito fundamental para la elaboración de chocolates finos (Armijos, 2002).

Según (Sancho, Bota, & De Castro, 1999), en el licor de cacao preparado para degustación se identifican tres grupos de sabores: (básicos, específicos y adquiridos) como se describe a continuación:

Cuando en los licores de cacao se describen con sabor ácido, estos expresan la presencia de ácidos volátiles y no volátiles y se percibe a los lados y centro de la lengua (frutas cítricas, vinagre); el amargor se describe como un sabor fuerte y amargo, en respuesta a la falta de fermentación y se percibe en la parte posterior de la lengua o en la garganta (café, cerveza, toronja); la astringencia se la describe como un sabor fuerte también por la falta de fermentación y se expresa como sequedad en la boca producto de la precipitación de las proteínas en la saliva, va acompañada de un aumento de salivación y se percibe en toda la boca, lengua, garganta y hasta en los dientes (cacao no fermentado, mango verde, hojas de plátano, carambola pintona); y como un sabor dulce se percibe una sensación dulzaina en la punta de la lengua (Sancho, Bota, & De Castro, 1999).

Los sabores específicos se describe a cacao que es el aroma típico de granos de cacao bien fermentados, secos, tostados y libre de defectos (barras de chocolate negro, cacao fermentado y tostado); el floral se describe con aroma a flores, con tonos perfumados (lilas, violetas, flores de cítricos); también se describe el sabor y aroma a fruta, combinado con notas dulzainas agradables (cualquier fruta seca y madura, ciruelas pasas y fruta cítrica madura y seca); y sabor a nuez se describe el sabor y aroma de almendras y nuez (Sancho, Bota, & De Castro, 1999).

Cuando en los licores de cacao se identifican con sabores adquiridos como mohoso es por una sobre fermentación de las almendras o por un secamiento incorrecto que favoreció la proliferación de hongos (sabor a pan viejo, musgo, olor a bosque); cuando se describe con sabor a químico es por la contaminación de combustibles, plaguicidas, desinfectantes u otros productos; los licores con sabor verde/crudo demuestran la insuficiencia de fermentación, o de tostado incompleto; también se describen licores contaminados por humo, usualmente por el uso de prácticas de secado artificial (humo de madera, notas fenólicas, jamón); igualmente se describen sabores en los que se percibe notas metálicas (Sancho, Bota, & De Castro, 1999).

Cuadro 3. Promedio de temperatura y humedad relativa ambiental, correspondiente a la fase de campo de la investigación.

Hora	Promedio	
	Temperatura (°C)	Humedad Relativa (%)
8:00	28,66	69
12:00	32,16	62
16:00	30,22	69

Ecológicamente el área de investigación de acuerdo a la clasificación de L. Holdridge corresponde al bosque húmedo subtropical (bh-subtropical).

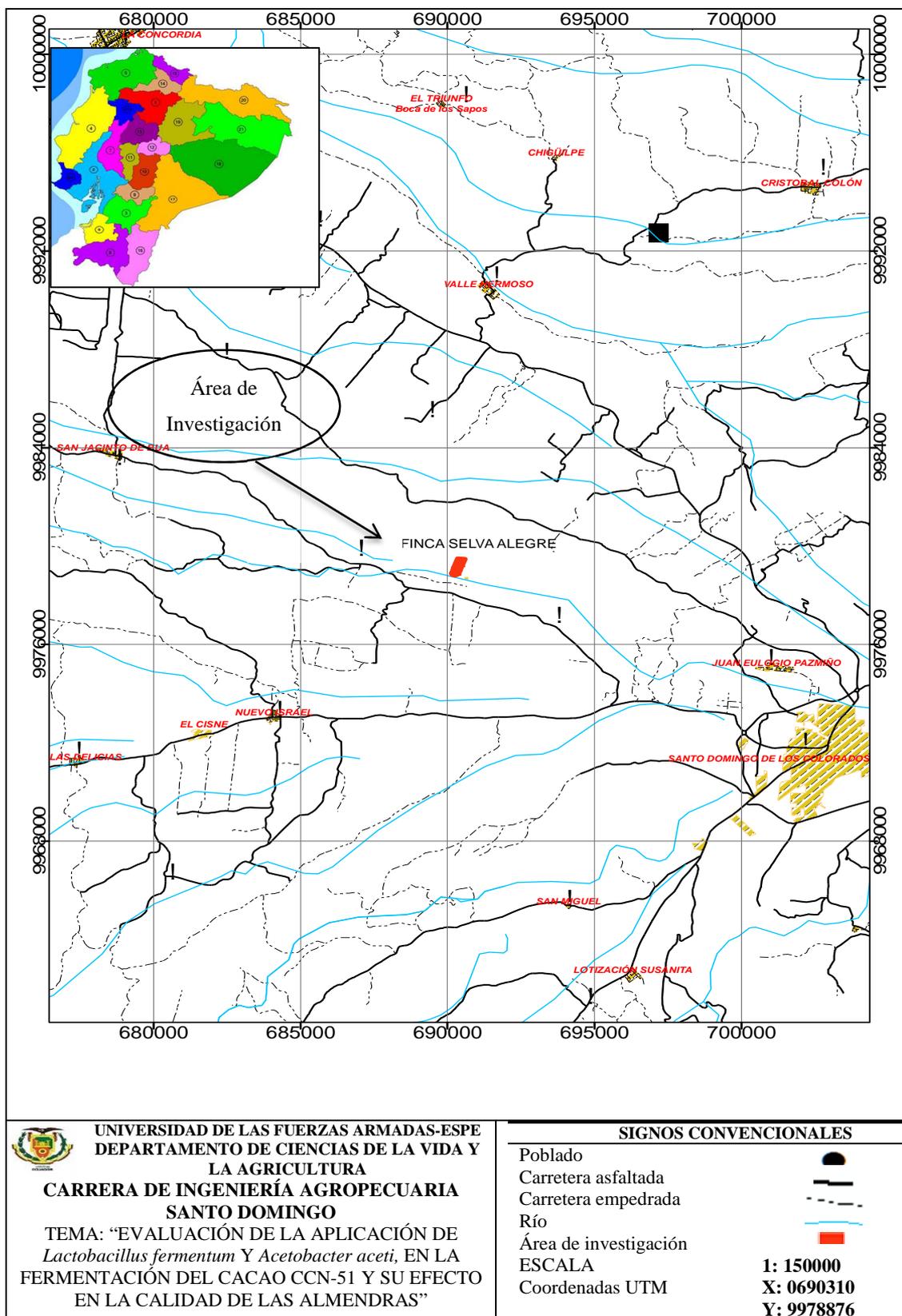


Figura 1. Ubicación geográfica del proyecto de investigación.

3.2. MATERIALES

3.2.1. Materiales de campo

Tablas de madera de laurel (*Cordia alliodora* (Ruiz & Pav.) Oken), bambú gigante (*Dreidrocalamus asper* (Schult) Backer), caña guadua (*Guadua angustifolia* Kunth), tarugos (clavos de madera), hojas de zinc, malla plástica, martillo, clavos, serrucho, cinta métrica machete, termómetro de punción, termo-higrómetro (Beurer HM16), pala de madera, arraladores (herramienta para remover las almendras en el secado), toros (herramienta para recoger las almendras después del secado), baldes de plástico, tijeras de podar, guantes, brochas, balanza, sacos de yute y plástico.

3.2.2. Materiales de Laboratorio

Balanza analítica (Ohaus), medidor de humedad (Multi-Grain), peachimetro (Oaklon 510), plato agitador orbital (Barnstead Thermolyne M66025), autoclave automática (Tuttnauer 2540M), plato calentador (Heildoph MR3001k), centrifuga (Hettich Zentrifugen Rotofix 32A), incubadora (Mettmert BE400), cámara de flujo laminar (Thermo 1849), estufa (Mettmert SM400), molino (Cuisinart Coffee bar DCG-20), refrigeradora, estereoscopio, cajas petri, placas pretifilm 3M™ Petrifilm™, tamiz con malla de acero inoxidable 42 mesh, papel Whatman Nro. 1, fundas de papel, azas, termómetro, vasos de precipitación, envases de vidrio, tubos de ensayo, gradilla, pipetas de precisión, agitador magnético, varilla agitadora, guantes, mascarilla, algodón, espátula, estilete, bisturí, mango de bisturí, mechero de bunsen, cronometro.

3.2.3. Insumos

Bacterias de Ácido Láctico (*Lactobacillus fermentum* ATCC® 15973™)
Bacterias del Ácido Acético (*Acetobacter aceti* ATCC® 15973™), medios de cultivo M.R.S. agar, G.Y.A. agar, caldos de cultivo M.R.S. broth, G.Y.A. broth, agua destilada.

3.3. MÉTODOS

3.3.1. Diseño Experimental

3.3.1.1. Factores y niveles a probar

FACTOR A: Aplicación de Bacterias

a₀: Aplicación de Bacterias de Ácido Láctico (24 horas)

a₁: Aplicación de Bacterias del Ácido Acético (48 horas)

a₂: Aplicación de Bacterias de Ácido Láctico (24 horas) y Bacterias del Ácido Acético (48 horas)

FACTOR B: Tiempo de fermentación

b₀: 72 horas de fermentación

b₁: 96 horas de fermentación

b₂: 120 horas de fermentación

3.3.1.2. Tratamientos a comparar

Producto de la combinación de los factores aplicación de bacterias y tiempo de fermentación, surgen los tratamientos que se presentan en el cuadro 4.

Cuadro 4. Tratamientos de la investigación “Evaluación de la aplicación de *Lactobacillus fermentum* y *Acetobacter aceti*, en la fermentación del cacao CCN-51 y su efecto en la calidad de las almendras”.

Tratamiento	Código	Descripción
T ₁	a ₀ b ₀	Aplicación de BAL + 72 horas de fermentación
T ₂	a ₀ b ₁	Aplicación de BAL + 96 horas de fermentación
T ₃	a ₀ b ₂	Aplicación de BAL + 120 horas de fermentación
T ₄	a ₁ b ₀	Aplicación de BAA + 72 horas de fermentación
T ₅	a ₁ b ₁	Aplicación de BAA + 96 horas de fermentación
T ₆	a ₁ b ₂	Aplicación de BAA + 120 horas de fermentación
T ₇	a ₂ b ₀	Aplicación de BAL y BAA + 72 horas de fermentación
T ₈	a ₂ b ₁	Aplicación de BAL y BAA + 96 horas de fermentación
T ₉	a ₂ b ₂	Aplicación de BAL y BAA + 120 horas de fermentación

3.3.1.3. Tipo de diseño

Esquema bifactorial (AxB→3x3) conducido en un diseño de bloques completamente al azar.

3.3.1.4. Numero de repeticiones

La investigación se realizó en tres bloques.

3.3.1.5. Características de la UE

Número de unidades experimentales	:	27
Volumen de las UE	:	0,125 m ³
Largo	:	0,50 m
Ancho	:	0,50 m
Alto	:	0,50 m
Forma de la UE	:	Cubo
Área total del ensayo	:	13,75 m ²
Largo	:	5,50 m
Ancho	:	2,50 m
Forma del área de investigación	:	Rectangular

3.3.1.6. Croquis del diseño

T4	T5	T3	T9	T2	T8	T6	T7	T1
T6	T1	T3	T5	T2	T9	T8	T7	T4
T4	T8	T1	T2	T5	T9	T3	T7	T6

Figura 2. Croquis del diseño de campo.

3.3.2. Análisis Estadístico

3.3.2.1. Esquema de análisis de varianza

Cuadro 5. Esquema de análisis de varianza.

Fuentes de variación	Grados de libertad
Bloques	2
Aplicación de bacterias	2
Tiempo de fermentación	2
Aplicación de bacterias *	4
Tiempo de fermentación	4
Error experimental	16
Total	26

3.3.2.2. Coefficiente de variación

$$Cv = \frac{\sqrt{CMe}}{\bar{X}} \times 100$$

Donde CMe es el cuadrado medio del error y \bar{X} es la media funcional del experimento. Se interpreta como el número de veces que la media está contenida en la desviación estándar. Suele darse su valor en tanto por ciento, multiplicando el resultado por 100.

3.3.2.3. Análisis funcional

Se realizó la prueba de Tukey para los factores que resultaron significativos en el análisis de varianza.

3.3.3. Variables a Medir

3.3.3.1. Análisis de las características físicas de las almendras de cacao.

Antes de iniciar el proceso de valoración de las características físicas de las almendras de cacao, se procedió a realizar un muestreo preliminar que se fundamenta en la Norma Técnica Ecuatoriana (NTE INEN177, 1995) Cacao en grano-Muestreo. Esta norma establece el procedimiento para la toma de muestra del cacao en grano.

Para el análisis de las características físicas de la almendra cacao se realizó en los laboratorios de la Universidad de las Fuerzas Armadas – ESPE, Carrera de Ingeniería Agropecuaria – Santo Domingo. Se receptaron 1000 gramos de almendras de cacao como muestra representativa por tratamiento, fueron envueltas en fundas de papel, y luego se identificó con códigos de acuerdo a los tratamientos.

1) **Determinación de humedad de las almendras de cacao**

Para determinar la humedad de las almendras de cacao se registró el peso de la masa fermentable fresca, asimismo después de la finalización del proceso de secado, se registró nuevamente el peso de las almendras secas una vez que alcanzaron el 7% de humedad.

Para medir la humedad de las almendras de cacao seco se recolecto una muestra representativa (1000 gramos) de cada uno de los tratamientos por separado, se colocó en el medidor de humedad, previamente calibrado para cacao, donde directamente indico el porcentaje (%) de humedad que tuvo la muestra. Luego se aplicó siguiente fórmula para su determinación.

$$\% \text{ de humedad} = \left(\frac{(\text{Peso humedo (kg)} - \text{Peso seco (kg)})}{\text{Peso humedo (kg)}} \right) \times 100$$

Fuente: (CATIE, 1982)

2) **Determinación del índice de semilla.**

Para la realización de esta determinación se ejecutó con almendras fermentadas, secas y limpias. Se tomaron 100 almendras como muestra al azar, los cuales se pesaron en una balanza analítica de precisión. Esta determinación se la realizo por triplicado para tener un promedio. Luego se aplicó la siguiente fórmula.

$$\text{Índice de semilla} = \frac{\text{Peso de la muestra de cacao (g)}}{100\text{granos}}$$

Fuente: (Amores, Palacios, Jiménez, & Zhang, 2009)

3) **Determinación del grado de fermentación, defectos y contaminación de las almendras de cacao**

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

- **Ensayo de corte**

Se fundamenta en características físicas de la almendra una vez que ha sufrido el proceso fermentativo y de secado. Se mezcló la muestra según la Norma Técnica Ecuatoriana (NTE INEN177, 1995). Se seleccionó 100 almendras al azar de la muestra representativa y se procedió a realizar un corte longitudinal por la parte central de cada uno de las 100 almendras, a fin de exponer la máxima superficie de corte de los cotiledones y se examinó de forma visual las dos mitades de cada almendra.

Luego se apreció las características encontradas en los procesos desarrollados en este trabajo y que permitió identificar la calidad del producto tal como se describe en la Norma Técnica Ecuatoriana (NTE INEN 176, 2000) Cacao en grano-Requisitos. Esta norma establece la clasificación y los requisitos de calidad que debe cumplir el cacao en grano beneficiado y los criterios que deben aplicarse para su clasificación. Luego se aplicara la siguiente fórmula para determinar el grado de fermentación.

$$\% \text{ Grado de fermentacion} = \frac{\text{Numero de granos fermentados}}{100 \text{ granos}} \times 100$$

Fuente: (Bravo & Mingo, 2011).

Adicional al grado de fermentación se determinó el grano defectuoso en porcentaje, realizando los siguientes cálculos, cuyas fórmulas se las establece a continuación:

Grano violáceo

$$\%V = \frac{\# \text{ granos violáceos}}{100 \text{ granos de la muestra}} \times 100$$

Grano mohoso

$$\%h = \frac{\# \text{ granos afectados con hongos}}{100 \text{ granos de la muestra}} \times 100$$

Grano pizarroso

$$\%Pz = \frac{\# \text{ granos pizarrosos}}{100 \text{ granos de la muestra}} \times 100$$

Grano germinado

$$\%G = \frac{\# \text{ granos germinados}}{100 \text{ granos de la muestra}} \times 100$$

Grano partido

$$\%P = \frac{\# \text{ granos partidos}}{100 \text{ granos de la muestra}} \times 100$$

Grano vano

$$\%Va = \frac{\# \text{ granos vanos}}{100 \text{ granos de la muestra}} \times 100$$

Fuente: (Bravo & Mingo, 2011).

3.3.3.2. Análisis de las características químicas de las almendras de cacao

Antes del inicio del proceso de valoración de las características químicas de las almendras de cacao, se procedió a un muestreo preliminar que se fundamenta en la Norma Técnica Ecuatoriana (NTE INEN177, 1995) Cacao en grano-Muestreo. Esta norma establece el procedimiento para la toma de muestra del cacao en grano.

Se receptaron 1000 g de almendras de cacao como muestra representativa, fueron envueltos en fundas de papel nuevas, luego se identificó con códigos de acuerdo a los tratamientos.

La determinación del pH de las almendras se realizó en los laboratorios de la Universidad de las Fuerzas Armadas - ESPE, Carrera de Ingeniería Agropecuaria Santo Domingo; mientras que para la determinación del porcentaje de grasa (Equipo Soxhlet), acidez titulable (NaOH 0,01 N/g), teobromina-cafeína (Cromatografía Líquida de alta resolución, HPLC) y polifenoles totales (Fotometría 760 nm), se envió una muestra de 1000 g de almendras de cacao de cada tratamiento al laboratorio de la Estación Experimental Santa Catalina del INIAP, para el análisis correspondiente.

1) Preparación de polvo de cacao

Se procedió a retirar cuidadosamente la testa a cada almendra manualmente con ayuda de los estiletes alrededor de 25 g de muestra, ya que en ella también se encuentran ciertos componentes importantes para el trabajo, los cuales podrían alterar los resultados, seguidamente se muelen los cotiledones utilizando el molino de café y se tamizo el polvo a través de una malla de 42 mesh.

2) **Determinación del pH de las almendras Cacao**

La determinación del pH se realizó, tomando 5 g de polvo de cacao con un tamaño de partícula de 42 mesh, se añadió 50 mL de agua destilada y se llevó a ebullición durante un minuto y luego se agito constante durante una hora con la ayuda del plato agitador orbital. El producto frio se centrifugo y se filtró el sobrenadante a través de papel Whatman No. 1. Se tomó una alícuota de 10 mL del filtrado para realizar la medición del pH de la solución con ayuda de peachímetro (Manual de Calidad, Departamento de Nutrición y Calidad), citado por (Armijos, 2002).

3.3.4. Métodos Específicos del Manejo del Experimento

3.3.4.1. Fase de construcción

1) Construcción de la estructura para la fermentación

Para construir la cubierta del lugar donde se realizó la fermentación del cacao se utilizó materiales disponibles en la finca. Los postes de bambú gigante fueron de 2,50 m de altura, a una distancia de 3,00 m entre postes. Para la estructura del techo se utilizó caña guadua y se cubrió con hojas de zinc. El piso se construyó con caña guadua partida para que filtre el mucilago de las almendras de cacao frescas. Las partes laterales y el tendal se taparon con malla plástica para evitar el acceso de animales que puedan causar alteraciones en la investigación.

2) Construcción de los Cajones

La construcción de los cajones, se lo realizo con tablas de madera de laurel secas, ya que es resistente a la humedad y no desprenden sustancias extrañas, que interfieren en la calidad final del cacao, con las siguientes medidas: 0,50 X 0,50 X 0,50m (ancho x largo x alto), para una capacidad de 68 kg de almendras frescas de

cacao, en la parte inferior se realizaron varias perforaciones de 1 cm de diámetro, con una separación de 10 cm. No se usaron clavos ni otros materiales de metal, una vez contruidos los cajones fueron colocados en la cubierta sobre soportes de 10 cm, para permitir el escurrimiento del mucílago y la aireación.

3) Curado de cajones

Una vez construido los cajones se procedió al curado de la madera con la finalidad de que los compuestos orgánicos que forman parte de la estructura de la madera no sean transmitidos al producto fermentable. La actividad del curado se realizó por una sola vez cuando los cajones son nuevos, utilizando mucilago de cacao, este mucilago fue aplicado tanto en las paredes y el piso de los cajones, para ello se usó brochas, con la finalidad de cubrir con una capa uniforme de mucilago en todas las superficies del cajón, este proceso se lo repitió tres veces para asegurar una completa cobertura.

3.3.4.2. Fase de laboratorio

1) Incubación de las bacterias de ácido láctico (*Lactobacillus fermentum*)

La cepa que se empleó en esta investigación es de procedencia Norteamericana (ATCC: American Type Culture Collection. Rockville, EU), *Lactobacillus fermentum* ATCC® 9338™, estos microorganismos fermentan la glucosa a ácido láctico y ácido acético, reducen fructosa a manitol y convierten ácido cítrico en ácido láctico y 2,3-butanodiol de la masa fermentable, además favorece al desarrollo de bacterias acéticas. Los microorganismos se reactivaron en el Laboratorio de microbiología de la Universidad de las Fuerzas Armadas - ESPE, Carrera de Ingeniería Agropecuaria Santo Domingo, donde se mantuvo las cepas activas para su posterior uso.

Se colocaron 55,25 g del medio de cultivo M.R.S. broth, en 1 litro de agua purificada, se dejó reposar 5 minutos y posteriormente se calentó agitando

frecuentemente y se llevó a ebullición durante 1 minuto para la disolución total. Luego se distribuyó en recipientes de vidrio apropiados y se esterilizó en autoclave a 121 °C durante 15 minutos.

Se inoculó de acuerdo a las instrucciones adjuntas. La inoculación de *Lactobacillus fermentum* ATCC® 9338™, fue directa para su activación ya que estaban en estado latente, se realizó en la cámara de flujo laminar.

Se inició sacando la unidad KWIK-STIK™ del almacenamiento que estaba en refrigeración a 4 °C y dejamos que el vial cerrado alcance temperatura ambiente. Se abrió el vial y se sacó la unidad KWIK-STIK™. Se quitó la parte removible de la etiqueta del equipo KWIK-STIK™. La etiqueta se colocó en la caja Petri del medio de M.R.S. agar, como identificación. Se tomó nota de la posición de la pastilla en el fondo del equipo y del depósito de líquido hidratante en la parte superior del equipo. Seguidamente se liberó el líquido hidratante, ejerciendo una fuerza en la ampolla del equipo para romperla, se permitió que el líquido hidratante fluya por el tallo del hisopo a la parte inferior de la unidad, donde estaba la pastilla. Se sostuvo el equipo en posición vertical, con la tapa hacia arriba, y luego se golpeó la base del equipo suavemente contra la mesa para facilitar el flujo del líquido. Posteriormente se trituró la pastilla y se mezcló con el líquido, hasta que las partículas de la pastilla tuvieron un tamaño uniforme y la suspensión tuvo un aspecto homogéneo.

Inmediatamente se saturó el hisopo con el material hidratado y se transfirió el material a las cajas Petri del medio de M.R.S. agar. Se giró el hisopo, aplicando leve presión, para inocular en forma de zigzag dentro de la caja Petri, con el mismo hisopo se realizó repetidamente (10 veces) en cajas Petri diferentes que contienen el medio de cultivo. Posteriormente se incubó el medio inoculado a una temperatura de 37 °C y permanecieron 72 horas para que se activen los microorganismos.

Una vez transcurridos las 72 horas con un aza se procedió a realizar un frotis a la caja de bacterias ya activadas, lo que se recogió en el aza de bacterias se sembró en 100 mL de caldo de cultivo M.R.S. broth. Seguidamente se incubó el medio de

cultivo M.R.S broth a 37 °C durante 72 horas, se recogió una muestra de 1 mL con una pipeta de precisión, luego la muestra se colocó en una placa petrifilm para después de 48 horas ser contadas las UFC.

2) Incubación de las bacterias del ácido acético (*Acetobacter aceti*)

La cepa que se empleó en esta investigación es de procedencia Norteamericana (ATCC: American Type Culture Collection. Rockville, EU), *Acetobacter aceti* ATCC® 15973™, estos microorganismos oxidan etanol a ácido acético de la masa fermentable. Los microorganismos se reactivaron en el Laboratorio de microbiología de la Universidad de las Fuerzas Armadas - ESPE, Carrera de Ingeniería Agropecuaria Santo Domingo, donde se mantuvo las cepas activas para su posterior uso.

Se colocaron 65 g del medio de carbonato cálcico G.Y.A. broth, en 1 litro de agua purificada, se dejó reposar 5 minutos y posteriormente se calentó agitando frecuentemente y se llevó a ebullición durante 1 minuto para la disolución total. Luego se distribuyó en recipientes de vidrio apropiados y se esterilizo en autoclave a 121 °C durante 15 minutos.

Se inoculo de acuerdo a las instrucciones adjuntas. La inoculación de *Acetobacter aceti* ATCC® 15973™, fue directa para su activación ya que estaban en estado latente, se realizó en la cámara de flujo laminar.

Se inició sacando la unidad KWIK-STIK™ del almacenamiento que estaba en refrigeración a 4 °C y dejamos que el vial cerrado alcance temperatura ambiente. Se abrió el vial y se sacó la unidad KWIK-STIK™. Se quitó la parte removible de la etiqueta del equipo KWIK-STIK™. La etiqueta se colocó en la caja Petri del medio de G.Y.A. agar, como identificación. Se tomó nota de la posición de la pastilla en el fondo del equipo y del depósito de líquido hidratante en la parte superior del equipo. Seguidamente se liberó el líquido hidratante, ejerciendo una fuerza en la ampolla de

la tapa del equipo para romperla, se permitió que el líquido hidratante fluya por el tallo del hisopo a la parte inferior de la unidad, donde estaba la pastilla. Se sostuvo el equipo en posición vertical, con la tapa hacia arriba, y luego se golpeó la base del equipo suavemente contra la mesa para facilitar el flujo del líquido. Posteriormente se trituro la pastilla y se mezcló en el líquido, hasta que las partículas de la pastilla tuvieron un tamaño uniforme y la suspensión tuvo un aspecto homogéneo.

Inmediatamente se saturó el hisopo con el material hidratado y se transfirió el material a las cajas Petri del medio de G.Y.A. agar. Se giró el hisopo, aplicando leve presión, para inocular en forma de zigzag dentro de la caja Petri, con el mismo hisopo se realizó repetidamente (10 veces) en cajas Petri diferentes que contienen el medio de cultivo. Posteriormente se incubó el medio inoculado a una temperatura de 26 °C y permanecieron 72 horas para que se activen los microorganismos.

Una vez transcurridos las 72 horas con un aza se procedió a realizar un frotis a la caja de bacterias ya activadas, lo que se recogió en el aza de bacterias se sembró en 100 mL de medio de cultivo G.Y.A. broth. Seguidamente se incubó el medio de cultivo G.Y.A. broth a 26 °C durante 72 horas, se recogió una muestra de 1 mL con una pipeta de precisión, luego la muestra se colocó en una placa petrifilm para después de 48 horas ser contadas las UFC.

3) Recuento de bacterias ácido lácticas y ácido acéticas

El recuento de la población de bacterias se realizó con placas 3M™ Petrifilm™, se utilizó esta placa para la verificación de la concentración de bacterias lácticas y bacterias acéticas. Estas placas 3M™ Petrifilm™ enumeran la flora total aeróbica presente en la muestra, por lo que se reducen las oportunidades de error cuando se compara con otros métodos.

Se procedió a esterilizar el material de trabajo que se utilizó y se esperó unos minutos. Se colocó la placa petrifilm en una superficie plana, se levantó el film

superior y con una pipeta de precisión perpendicular a la placa petrifilm se colocó 1 mL de muestra que se obtuvo del medio de cultivo M.R.S broth ya incubado y se lo depositó en el centro del film, el mismo procedimiento se lo realizó con el medio de cultivo GYA broth, para el conteo de la concentración de las UFC de las dos bacterias.

Con la cara lisa hacia arriba, colocamos el aplicador en el film superior sobre el inóculo para formar el círculo en el que se van a contar las bacterias. Con cuidado se ejerció una presión sobre el aplicador para repartir el inóculo sobre el área circular, luego se levantó el aplicador y se esperó un minuto a que se solidifique el gel, después se procedió a incubar las placas a 37 °C y 26 °C las bacterias *Lactobacillus fermentum* y *Acetobacter aceti* respectivamente por 48 horas. Luego de las 48 horas de incubación de las placas se procedió a contar las UFC con la ayuda de un estereoscopio.

4) Temperatura de la masa de cacao en fermentación

Para determinar las variaciones de temperatura de la masa en fermentación, esta se registró tres veces al día (08h00, 12h00 y 16h00), muestreando a 20 cm de profundidad, utilizando para el efecto un termómetro de punción. Paralelamente se registró la temperatura y humedad del ambiente con ayuda de un termo-higrómetro a las mismas horas indicadas anteriormente.

3.3.4.3. Fase de campo

1) Manejo del beneficio de la materia prima en estudio

- Recepción

La materia prima se obtuvo en la finca del Sr. Edison Erazo ubicada en la Provincia Santo Domingo de los Tsáchilas, Cantón Santo Domingo, Parroquia San Jacinto del Búa, sector “El Recreo”, finca “Selva Alegre”.

- **Quiebra**

Con una herramienta, se abrió la mazorca y se separó en forma manual las almendras del maguey, las que se colocaron en un balde, con el objetivo de impedir que se escurra el mucilago del cacao.

- **Traslado**

Se trasladó las almendras de cacao, hasta el lugar del ensayo.

- **Pesada**

Se pesó 68 kg de almendras y se colocaron en los cajones de madera.

- **Tapado**

Con hojas de plátano y sacos de yute se cubrió las almendras depositadas en los cajones, para evitar la pérdida del calor y poder controlar la temperatura.

- **Aplicación de la bacteria *Lactobacillus fermentum* en la masa fermentable**

24 horas después de colocar las almendras en el cajón, se realizó la aplicación de las bacterias de ácido láctico, de acuerdo con los tratamientos anteriormente mencionados; con densidades de población de $8,5 \pm 0,5 \log$ UFCg-1, ya que esta densidad es igual al tamaño de la población que se encuentran en fermentaciones naturales (Papalexandratou, y otros, 2011).

- **Volteo**

Una vez iniciado el proceso de fermentación, se realizó el volteo de las almendras a las 48, 72 y 96 horas de acuerdo a los tratamientos mencionados, luego de cada volteo se tapó con hojas de plátano.

- **Aplicación de las bacteria *Acetobacter aceti* en la masa fermentable**

Durante el primer volteo (48 horas), se realizó la aplicación de las bacterias del ácido acético, de acuerdo con los tratamientos anteriormente mencionados; con densidades de población de $8,0 \pm 0,5 \log \text{ UFCg-1}$, ya que esta densidad es igual al tamaño de la población que se encuentran en fermentaciones naturales (Papalexandratou, y otros, 2011).

- **Secado**

Culminado el proceso de fermentación, se pesó y se registró, posteriormente se colocaron las almendras de cacao en un tendal para proceder con el secado, removiéndolas cada 30 minutos para uniformizar la pérdida de agua. Este proceso se llevó a cabo hasta que las almendras tengan 7 % de humedad, valor que se obtuvo con un medidor de humedad.

IV. RESULTADOS

Los resultados obtenidos de los parámetros físicos y químicos estudiados, fueron analizados estadísticamente utilizando el programa INFOSTAT, mediante un análisis de varianza ADEVA, y se aplicó la prueba de Tukey al 5 % de probabilidad para establecer los rangos de significancia.

4.1. TEMPERATURA DE LA MASA DE CACAO EN FERMENTACIÓN

Al realizar los análisis de varianza desde el inicio hasta el final de la fermentación los resultados mostraron diferencias estadísticas altamente significativas entre tratamientos para el factor aplicación de bacterias a las 48 horas, como se indica en el siguiente ADEVA (cuadro 6).

Cuadro 6. Análisis de varianza de la temperatura a las 48 horas de fermentación de las almendras de cacao, en función a al factor de la aplicación de bacterias.

Fuentes de Variación	SC	GL	CM	F	p-valor	
Bloque	1,41	2	0,7	2,14	0,15	ns
Aplicación de bacterias	48,3	2	24,15	73,46	<0,0001	**
a2 vs a0 , a1	21,41	1	21,41	65,13	<0,0001	**
a0 vs a1	26,89	1	26,89	81,8	<0,0001	**
Tiempo de fermentación	0,3	2	0,15	0,45	0,645	ns
Aplicación de bacterias *	1,48	4	0,37	1,13	0,3788	ns
Tiempo de fermentación						
Error	5,26	16	0,33			
Total	56,74	26				
C.V.				1,41		

Se encontraron diferencias altamente significativas para el factor aplicación de bacterias a las 48 horas después de la cosecha, así como en las comparaciones entre a2 vs. a0, a1; y a0 vs. a1.

En la figura 3, se muestran diferencias altamente significativas para el factor de aplicación de bacterias, así como la comparación entre a2 vs. a0, a1 (a), y a0 vs. a1 (b) para la variable temperatura de la masa fermentable a las 48 horas de fermentación. Se puede observar que existió diferencia altamente significativa en la temperatura a las 48 horas de fermentación de 42 °C cuando se aplicó *Lactobacillus fermentum* en los tratamientos, lo que indica que al aplicar esta bacteria a las 24 horas después de la cosecha aumento la temperatura, a diferencia cuando no se aplica esta bacteria en la masa fermentable.

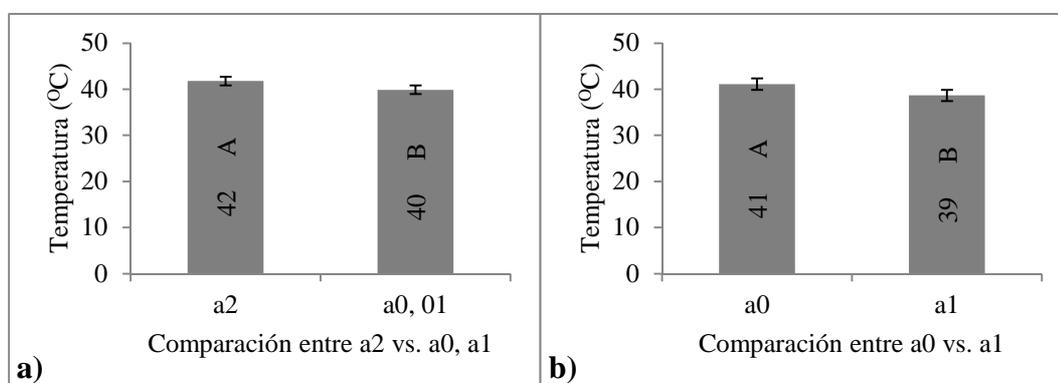


Figura 3. Temperatura de la masa fermentable a las 48 horas de fermentación entre comparaciones de a2 vs. a0, a1 (a), y a0 vs. a1 (b).

En la figura 4, se muestra la temperatura de la masa de cacao en los cajones desde el inicio al final de la fermentación, en los días de cosecha tenían una temperatura de 24 °C en promedio similar al del ambiente, a las 24 horas de fermentación la temperatura de la masa fermentable aumento a 33 °C, sin tener diferencia estadística entre tratamientos, a las 48 horas de fermentación hubo una diferencia altamente significativa para el factor aplicación de bacterias entre los tratamientos que se les aplico la bacteria *Lactobacillus fermentum*, los resultados obtenidos indican que al aplicar esta bacteria a las 24 horas después de la cosecha aumenta la temperatura a diferencia de los tratamientos que no se les aplico la bacteria, a las 72 horas de fermentación aumenta la temperatura llegando a los 45 °C en promedio sin tener diferencia estadística entre los tratamientos, luego a las 96 y

120 horas de fermentación empieza a disminuir la temperatura a 44 y 42 °C respectivamente, sin tener diferencias estadísticas entre los tratamientos.

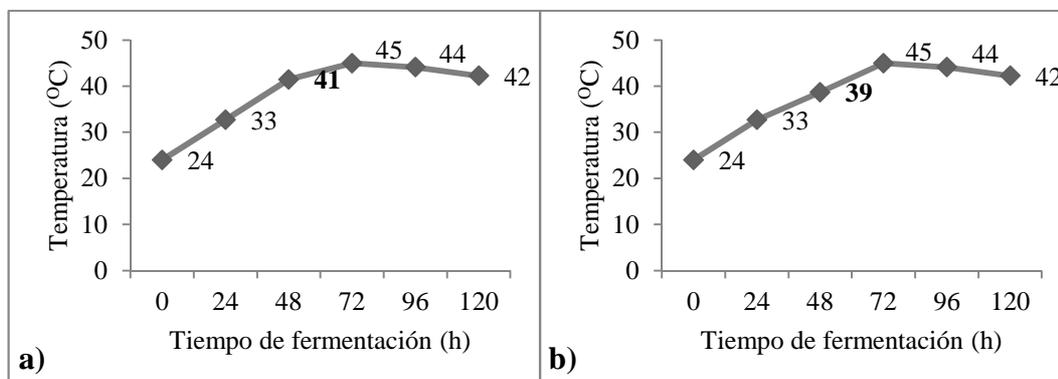


Figura 4. Temperatura de la masa fermentable desde el inicio al final de la fermentación, promedio de temperatura del factor a0 y a2 (a), y promedio de temperatura del factor a1 (b).

4.2. PESO DE LAS ALMENDRAS DE CACAO AL FINAL DE LA FERMENTACIÓN

En el ADEVA (cuadro 7), se muestran diferencias estadísticas altamente significativas para el factor tiempo de fermentación de la variable del peso de las almendras de cacao al final de la fermentación.

Cuadro 7. Análisis de varianza del peso de las almendras de cacao al final de la fermentación, en función a los factores de la aplicación de bacterias, tiempo de fermentación e interacción entre aplicación de bacterias x tiempo de fermentación.

Fuentes de Variación	SC	GL	CM	F	p-valor	
Bloque	0,74	2	0,37	2,63	0,1028	ns
Aplicación de bacterias	0,2	2	0,1	0,7	0,5113	ns
Tiempo de fermentación	73,11	2	36,55	260,11	<0,0001	**
Lineal	73,04	1	73,04	519,78	<0,0001	**
Cuadrática	0,06	1	0,06	0,45	0,5137	ns
Aplicación de bacterias *	0,33	4	0,08	0,58	0,6816	ns
Tiempo de fermentación						
Error	2,25	16	0,14			
Total	76,62	26				
C.V.				0,81		

Se encontraron diferencias altamente significativas para el factor tiempo de fermentación con tendencia lineal hasta 120 horas de fermentación, pero no hubo diferencia significativa para el factor aplicación de bacterias ni en la interacción aplicación de bacterias x tiempo de fermentación.

En la figura 5, se muestra la línea de tendencia para el factor tiempo de fermentación, para la variable peso de las almendras de cacao al final de la fermentación. Se puede observar que el peso tiene una relación inversamente proporcional al tiempo de fermentación, esto quiere decir que mientras más tiempo pase en las cajas de fermentación menor es el peso de la masa fermentable al final de la fermentación. Al tercer día de fermentación presentan valores promedios del 48,23 kg de peso, lo que indica que ha perdido el 29,07% de humedad y al quinto día de fermentación las almendras de cacao llegan a un peso promedio de 44,20 kg, lo que indica que las almendras de cacao han perdido el 35% de humedad desde el inicio de la fermentación.

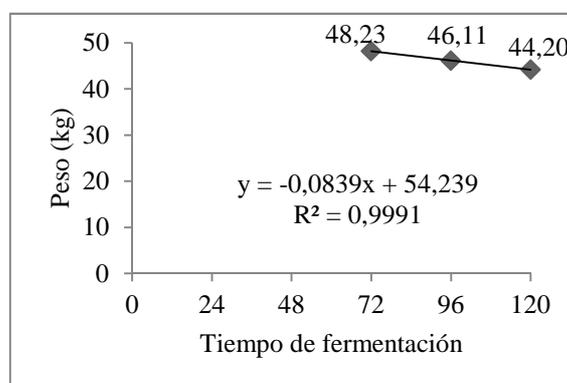


Figura 5. Peso de las almendras de cacao al final de la fermentación en función al factor tiempo de fermentación.

4.3. PESO DE LAS ALMENDRAS DE CACAO AL FINAL DEL SECADO

En el ADEVA (cuadro 8), se muestran que no existe diferencias estadísticas significativas para los factores aplicación de bacterias, tiempo de fermentación ni en la interacción de aplicación de bacterias x tiempo de fermentación de la variable del peso de las almendras de cacao al final del secado.

Cuadro 8. Análisis de varianza del peso de las almendras de cacao al final del secado, en función a los factores de la aplicación de bacterias, tiempo de fermentación e interacción entre aplicación de bacterias x tiempo de fermentación.

Fuentes de Variación	SC	GL	CM	F	p-valor	
Bloque	0,25	2	0,12	1,36	0,2847	ns
Aplicación de bacterias	0,37	2	0,18	2,04	0,1624	ns
Tiempo de fermentación	0,14	2	0,07	0,77	0,4778	ns
Aplicación de bacterias *	0,9	4	0,23	2,51	0,0832	ns
Tiempo de fermentación						
Error	1,44	16	0,09			
Total	3,1	26				
C.V.			1,35			

No se encontraron diferencias significativas para los factores aplicación de bacterias, tiempo de fermentación ni en la interacción entre aplicación de bacterias x tiempo de fermentación de la variable peso de las almendras de cacao al final del secado.

En el cuadro 8 se puede observar los resultados del peso de las almendras de cacao al final del secado, cuando las almendras de cacao alcanzan el 7% de humedad (cero relativo), indicando que no existe diferencia estadística de peso al final del secado ya que se encuentran entre 22-22,60 kg. Los factores aplicación de bacterias, tiempo de fermentación y la interacción entre aplicación de bacterias x tiempo de fermentación no actúan sobre la variable peso final de las almendras de cacao.

4.4. INDICE DE SEMILLA

En el ADEVA (cuadro 9), se muestran que no existe diferencias estadísticas significativas para los factores aplicación de bacterias, tiempo de fermentación ni en la interacción de aplicación de bacterias x tiempo de fermentación de la variable del índice de semilla.

Cuadro 9. Análisis de varianza del índice de semilla (IS), al 7% de humedad, en función a los factores de la aplicación de bacterias, tiempo de fermentación e interacción entre aplicación de bacterias x tiempo de fermentación.

Fuentes de Variación	SC	GL	CM	F	p-valor	
Bloque	9,04	2	4,52	0,48	0,627	ns
Aplicación de bacterias	19,26	2	9,63	1,02	0,3817	ns
Tiempo de fermentación	15,87	2	7,94	0,84	0,4484	ns
Aplicación de bacterias *	31,33	4	7,83	0,83	0,5239	ns
Tiempo de fermentación						
Error	150,5	16	9,41			
Total	226,01	26				
C.V.				2,09		

No se encontraron diferencias significativas para los factores aplicación de bacterias, tiempo de fermentación ni en la interacción entre aplicación de bacterias x tiempo de fermentación.

En el cuadro 9 se puede observar los resultados del índice de semilla, cuando las almendras de cacao alcanzan el 7% de humedad (cero relativo), indicando que no existe diferencia estadística de peso de la semilla al final del secado ya que se encuentran entre 144,27-149,04 g. Los factores aplicación de bacterias, tiempo de fermentación y la interacción entre aplicación de bacterias x tiempo de fermentación no actúan sobre la variable índice de semilla.

4.5. GRADO DE FERMENTACIÓN

En el ADEVA (cuadro 10), se muestran que existe diferencias estadísticas significativas para los factores aplicación de bacterias, tiempo de fermentación, pero no en la interacción de aplicación de bacterias x tiempo de fermentación de la variable grado de fermentación.

Cuadro 10. Análisis de varianza del grado de fermentación, en función a los factores de la aplicación de bacterias, tiempo de fermentación e interacción entre aplicación de bacterias x tiempo de fermentación.

Fuentes de Variación	SC	GL	CM	F	p-valor	
Bloque	3,63	2	1,81	2,23	0,1402	ns
Aplicación de bacterias	84,96	2	42,48	52,14	<0,0001	**
a2 vs. a0, a1	58,07	1	58,07	71,27	<0,0001	**
a0 vs. a1	26,89	1	26,89	33,00	<0,0001	**
Tiempo de fermentación	117,85	2	58,93	72,32	<0,0001	**
Lineal	117,56	1	117,56	144,27	<0,0001	**
Cuadrática	0,30	1	0,30	0,36	0,5549	ns
Aplicación de bacterias * Tiempo fermentación	4,59	4	1,15	1,41	0,2758	ns
Error	13,04	16	0,81			
Total	224,07	26				
C.V.				1,12		

Se encontraron diferencias altamente significativas para el factor aplicación de bacterias así como en las comparaciones entre a2 vs. a0, a1, y a0 vs. a1; también se encontró diferencia altamente significativas en el factor tiempo de fermentación con tendencia lineal hasta 120 horas de fermentación, pero no hubo diferencia significativa en la interacción aplicación de bacterias x tiempo de fermentación.

En la figura 6 (a), se muestran diferencias estadísticas significativas para el factor de aplicación de bacterias, así como la comparación entre a2 vs. a0, a1, para la variable de grado de fermentación. Se puede observar que existió diferencia significativa en el grado de fermentación con un 83% de almendras fermentadas y

secas, lo que nos indica que al utilizar las bacterias *Lactobacillus fermentum* + *Acetobacter aceti*, se obtiene un mejor grado de fermentación, que al utilizarlas por separado.

En la figura 6 (b), se muestran diferencias estadísticas significativas para el factor de aplicación de bacterias, así como la comparación entre a0 vs. a1, para la variable de grado de fermentación. Se puede observar que existió diferencia significativa en el grado de fermentación con 81% de almendras fermentadas y secas, lo que nos indica que al utilizar las bacterias ácido lácticas (*Lactobacillus fermentum*) se obtiene un mejor grado de fermentación, que al utilizar bacterias ácido acéticas (*Acetobacter aceti*).

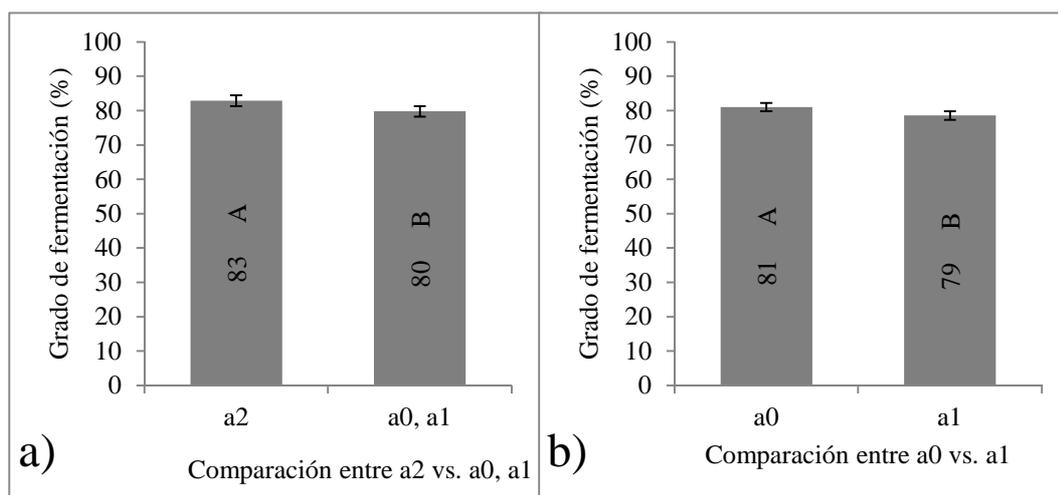


Figura 6. Grado de fermentación entre comparaciones de a2 vs. a0, a1 (a); y a0 vs. a1 (b).

En la figura 7, se muestran la línea de tendencia para el factor tiempo de fermentación, para la variable de grado de fermentación. Se puede observar que el grado de fermentación, va en forma ascendente en relación al tiempo de fermentación, esto quiere decir que mientras más tiempo pase mayor es el grado de fermentación de las almendras de cacao.

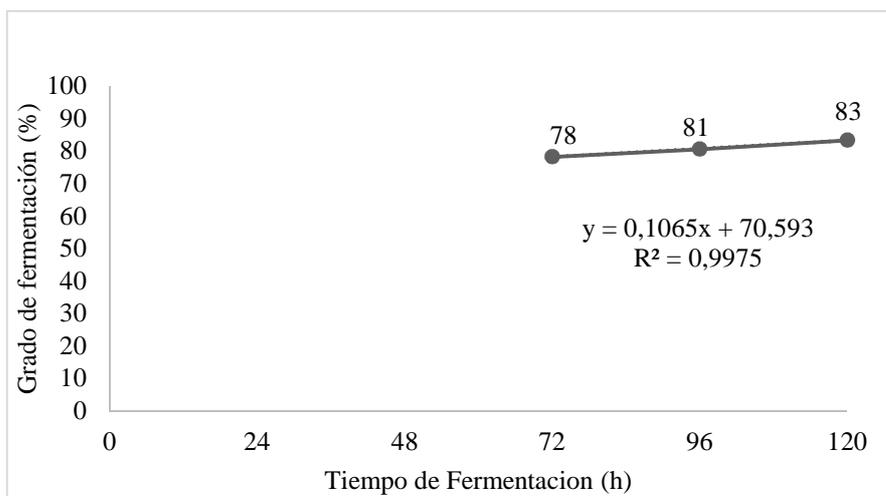


Figura 7. Grado de fermentación en función al factor tiempo de fermentación.

En la figura 8, se muestran los tratamientos del ensayo en función de la aplicación de bacterias y tiempo de fermentación sobre las características físicas de la almendra de cacao. Al realizar la comparación entre tratamientos, el análisis estadístico nos muestra que el tratamiento a2 (*Lactobacillus fermentum* + *Acetobacter aceti*) a los 120 días es significativo estadísticamente frente a los otros tratamientos, ya que presenta un mayor grado de fermentación con 86%, un menor porcentaje de granos violeta 11% y un menor porcentaje de granos pastosos 3%.

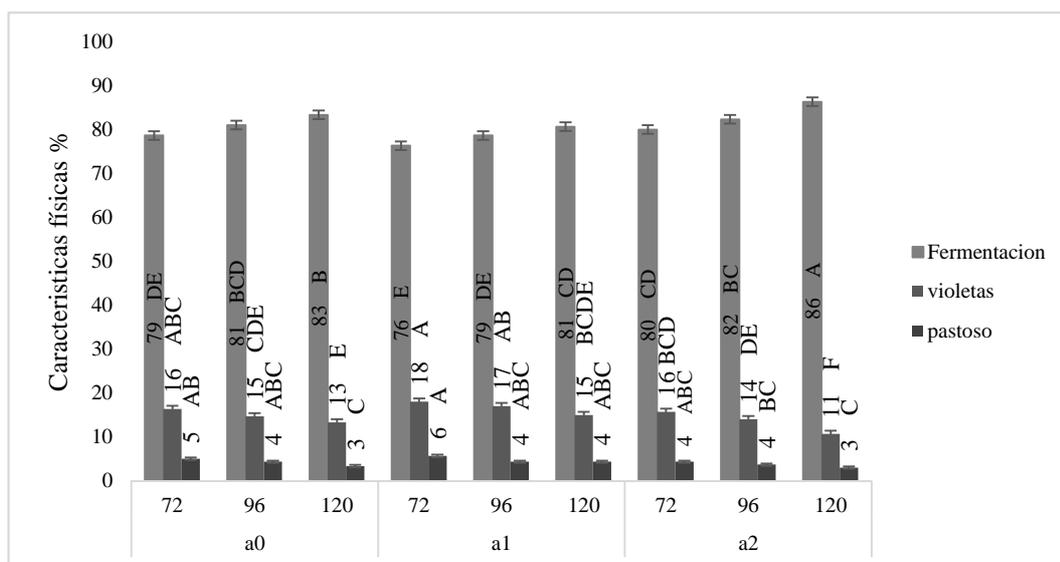


Figura 8. Interacción de tratamientos en función de la aplicación de bacterias y tiempo de fermentación sobre las características físicas de las almendras de cacao.

4.6. CONTENIDO DE GRASA

En el ADEVA (cuadro 11), se muestran que no existe diferencias estadísticas significativas para los factores aplicación de bacterias, tiempo de fermentación, ni en la interacción de aplicación de bacterias x tiempo de fermentación de la variable contenido de grasa.

Cuadro 11. Análisis de varianza del contenido de grasa, en función a los factores de la aplicación de bacterias, tiempo de fermentación e interacción entre aplicación de bacterias x tiempo de fermentación.

Fuentes de Variación	SC	GL	CM	F	p-valor	
Bloque	2,17E+00	2	1,09E+00	0,88	0,4323	ns
Aplicación de bacterias	1,63	2	0,82	0,67	0,5275	ns
Tiempo fermentación	2,28	2	1,14	0,93	0,415	ns
Aplicación de bacterias *	11,61	4	2,9	2,37	0,0966	ns
Tiempo fermentación						
Error	19,64	16	1,23E+00			
Total	37,34	26				
C.V.				2,29		

No se encontraron diferencias significativas en los tratamientos del porcentaje de contenido de grasa para los factores aplicación de bacterias, tiempo de fermentación ni en la interacción entre aplicación de bacterias x tiempo de fermentación.

En el cuadro 11 se puede observar los resultados del contenido de grasa, indicando que no existe diferencia estadística ya que se encuentran entre 47,04 - 49,5 %. Los factores aplicación de bacterias, tiempo de fermentación y la interacción entre aplicación de bacterias x tiempo de fermentación no actúan sobre la variable del contenido de grasa.

4.7. pH DE LAS ALMENDRAS DE CACAO

En el ADEVA (cuadro 12), se muestran que no existe diferencias estadísticas significativas para los factores aplicación de bacterias, tiempo de fermentación, ni en la interacción de aplicación de bacterias x tiempo de fermentación de la variable pH de las almendras de cacao.

Cuadro 12. Análisis de varianza del pH de las almendra de cacao, en función a los factores de la aplicación de bacterias, tiempo de fermentación e interacción entre aplicación de bacterias x tiempo de fermentación.

Fuentes de Variación	SC	GL	CM	F	p-valor	
Bloque	0,02	2	0,01	0,25	0,7851	ns
Aplicación de bacterias	0,6	2	0,3	7,62	0,0047	*
a2 vs a0 , a1	0,34	1	0,34	8,47	0,0102	*
a0 vs a1	0,27	1	0,27	6,78	0,0192	*
Tiempo fermentación	1,83	2	0,91	23,04	<0,0001	**
Lineal	1,74	1	1,74	43,91	<0,0001	**
Cuadrática	0,09	1	0,09	2,18	0,1594	ns
Aplicación de bacterias * Tiempo fermentación	0,07	4	0,02	0,41	0,7961	ns
Error	0,63	16	0,04			
Total	3,15	26				
C.V.	3,70					

Se encontraron diferencias significativas para el factor aplicación de bacterias así como en las comparaciones entre a2 vs. a0, a1, y a0 vs. a1; también se encontró diferencia altamente significativas en el factor tiempo de fermentación con tendencia lineal hasta 120 horas de fermentación, pero no hubo diferencia significativa en la interacción aplicación de bacterias x tiempo de fermentación.

En la figura 9 (a), se muestran diferencias estadísticas significativas para el factor de aplicación de bacterias, así como la comparación entre a2 vs. a0, a1, para la variable de pH de las almendras de cacao. Se puede observar que existió diferencia significativa en el pH de las almendras con 5,36, lo que indica que al utilizar las

bacterias *Lactobacillus fermentum* + *Acetobacter aceti*, obtenemos pH más bajo, que al utilizarlas por separado.

En la figura 9 (b), se muestran diferencias estadísticas significativas para el factor de aplicación de bacterias, así como la comparación entre a0 vs. a1, para la variable pH de las almendras de cacao. Se puede observar que existió diferencia significativa en el pH de las almendras con 5,42, lo que indica que al utilizar las bacterias ácido lácticas (*Lactobacillus fermentum*) obtenemos un pH más alto, que al utilizar bacterias ácido acéticas (*Acetobacter aceti*).

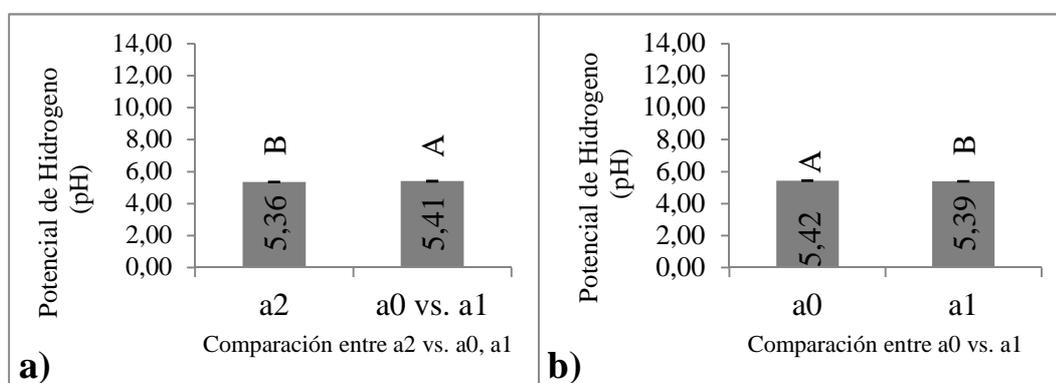


Figura 9. pH de las almendras de cacao entre comparaciones de a2 vs. a0, a1 (a), y a0 vs. a1 (b).

En la figura 10, se muestran la línea de tendencia para el factor tiempo de fermentación, para la variable de pH de las almendras de cacao. Se puede observar que el pH de las almendras, va en forma descendente en relación al tiempo de fermentación, esto quiere decir que mientras más tiempo pase más bajo es el pH de las almendras de cacao.

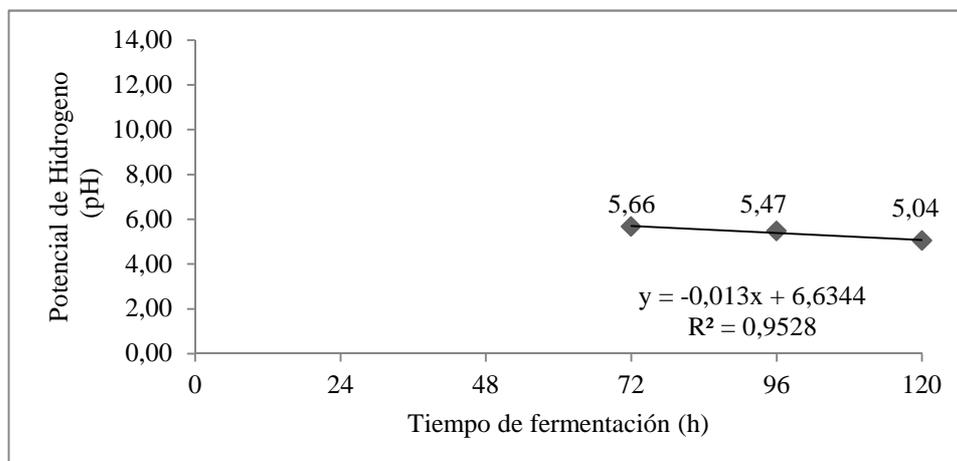


Figura 10. pH de las almendras de cacao en función al factor tiempo de fermentación.

4.8. ACIDEZ TITULABLE

En el ADEVA (cuadro 13), se muestran que existe diferencias estadísticas significativas para los factores aplicación de bacterias y tiempo de fermentación, de la variable pH de las almendras de cacao.

Cuadro 13. Análisis de varianza de la acidez titulable de las almendra de cacao, en función a los factores de la aplicación de bacterias y tiempo de fermentación.

Fuentes de Variación	SC	GL	CM	F	p-valor	
Bloque	0,02	2	0,01	1,82	0,1943	
Aplicación de bacterias	0,06	2	0,03	5,53	0,015	*
a2 vs a0 , a1	0,04	1	0,04	7,13	0,0168	*
a0 vs a1	0,02	1	0,02	3,93	0,065	ns
Tiempo fermentación	0,22	2	0,11	21,89	<0,0001	**
Lineal	0,22	1	0,22	43,64	<0,0001	**
Cuadrática	7,40E-04	1	7,40E-04	0,15	0,7079	ns
Aplicación de bacterias *	0,01	4	3,70E-03	0,73	0,5862	ns
Tiempo fermentación						
Error	0,08	16	0,01			
Total	0,39	26				
C.V.			9,98			

Se encontraron diferencias significativas para el factor aplicación de bacterias así como en las comparaciones entre a2 vs. a0, a1; también se encontró diferencia altamente significativas en el factor tiempo de fermentación con tendencia lineal hasta 120 horas de fermentación, pero no hubo diferencia significativa en la interacción aplicación de bacterias x tiempo de fermentación.

En la figura 11, se muestran diferencias estadísticas significativas para el factor de aplicación de bacterias, así como la comparación entre a2 vs. a0, a1, para la variable de acidez titulable de las almendras de cacao. Se puede observar que existió diferencia significativa en la acidez titulable de las almendras con 0,77 mlNa(OH) 0,1 N/g], lo que indica que al utilizar las bacterias *Lactobacillus fermentum* + *Acetobacter aceti*, obtenemos mayor acidez titulable, que al utilizarlas por separado.

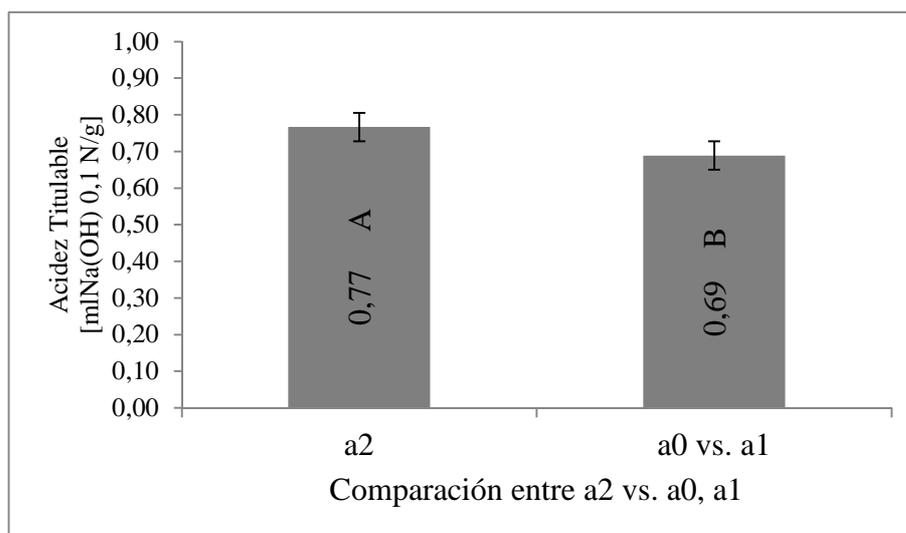


Figura 11. Acidez titulable de las almendras de cacao entre comparaciones de a2 vs. a0, a1.

En la figura 12, se muestran la línea de tendencia para el factor tiempo de fermentación, para la variable de acidez titulable de las almendras de cacao. Se puede observar que la acidez titulable de las almendras, va en forma ascendente en relación al tiempo de fermentación, esto quiere decir que mientras más tiempo pase mayor es la acidez titulable de las almendras de cacao.

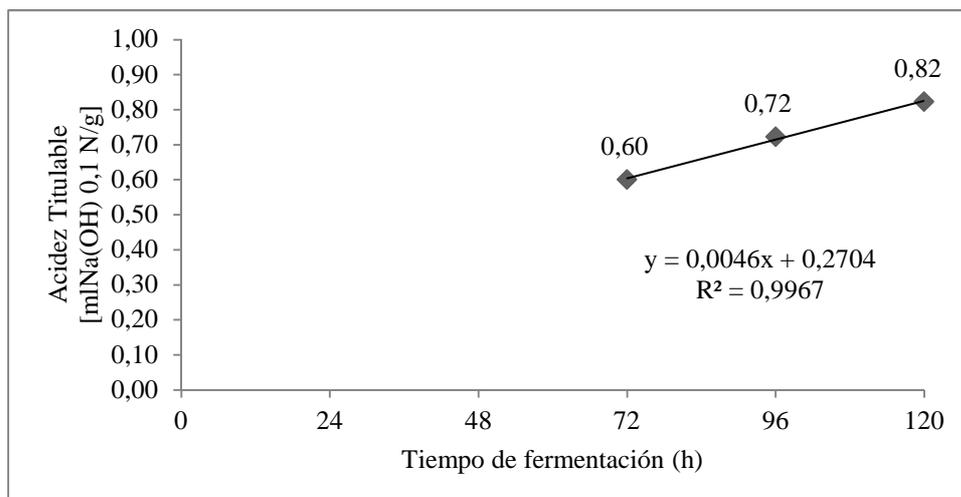


Figura 12. Acidez titulable de las almendras de cacao en función al factor tiempo de fermentación.

4.9. TEOBROMINA

En el ADEVA (cuadro 14), se muestran que existe diferencias estadísticas significativas para los factores aplicación de bacterias y tiempo de fermentación, de la variable teobromina.

Cuadro 14. Análisis de varianza de la teobromina, en función a los factores de la aplicación de bacterias y tiempo de fermentación.

Fuentes de Variación	SC	GL	CM	F	p-valor	
Bloque	0,01	2	2,60E-03	0,39	0,6822	ns
Aplicación de bacterias	0,35	2	0,18	26,87	<0,0001	**
a2 vs a0 , a1	0,23	1	0,23	35,12	<0,0001	**
a0 vs a1	0,12	1	0,12	18,62	0,0005	**
Tiempo fermentación	0,41	2	0,21	31,74	<0,0001	**
Lineal	0,39	1	0,39	59,26	<0,0001	**
Cuadrática	0,03	1	0,03	4,22	0,0567	ns
Aplicación de bacterias *	0,05	4	0,01	1,93	0,1546	ns
Tiempo fermentación						
Error	0,1	16	0,01			
Total	0,93	26				
C.V.				4,19		

Se encontraron diferencias significativas para el factor aplicación de bacterias así como en las comparaciones entre a2 vs. a0, a1, y a0 vs. a1; también se encontró diferencia altamente significativas en el factor tiempo de fermentación con tendencia lineal, pero no hubo diferencia significativa en la interacción aplicación de bacterias x tiempo de fermentación.

En la figura 13 (a), se muestran diferencias estadísticas significativas para el factor de aplicación de bacterias, así como la comparación entre a2 vs. a0, a1, para la variable de teobromina de las almendras de cacao. Se puede observar que existió diferencia significativa en el porcentaje de teobromina de las almendras con 2,06 %, lo que indica que al utilizar las bacterias *Lactobacillus fermentum* + *Acetobacter aceti*, obtenemos un porcentaje mayor de teobromina, que al utilizarlas por separado.

En la figura 13 (b), se muestran diferencias estadísticas significativas para el factor de aplicación de bacterias, así como la comparación entre a0 vs. a1, para la variable teobromina de las almendras de cacao. Se puede observar que existió diferencia significativa en el porcentaje de teobromina de las almendras con 1,78 %, lo que indica que al utilizar las bacterias ácido lácticas (*Lactobacillus fermentum*) obtenemos un porcentaje de teobromina menor, que al utilizar bacterias ácido acéticas (*Acetobacter aceti*).

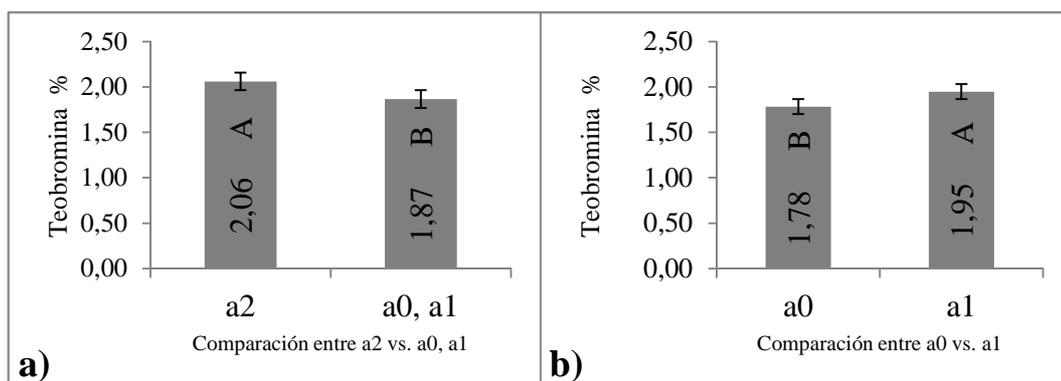


Figura 13. Porcentaje de teobromina de las almendras de cacao entre comparaciones de a2 vs. a0, a1 (a), y a0 vs. a1 (b)

En la figura 14, se muestran la línea de tendencia para el factor tiempo de fermentación, para la variable de teobromina de las almendras de cacao. Se puede observar que el porcentaje de teobromina de las almendras, va en forma descendente en relación al tiempo de fermentación, esto quiere decir que mientras más tiempo pase más bajo es el porcentaje de teobromina de las almendras de cacao.

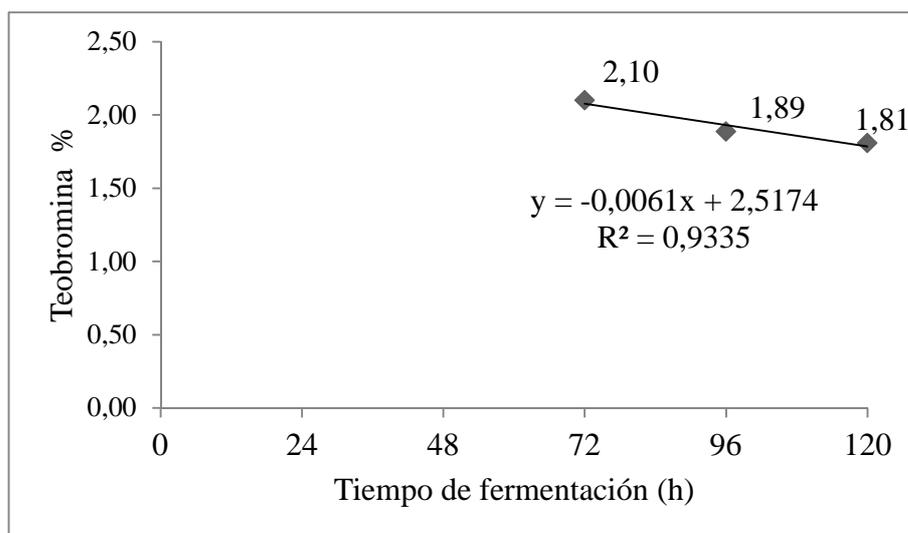


Figura 14. Acidez titulable de las almendras de cacao en función al factor tiempo de fermentación.

4.10. CAFEÍNA

En el ADEVA (cuadro 15), se muestran que no existe diferencias estadísticas significativas para los factores aplicación de bacterias, tiempo de fermentación, ni en la interacción de aplicación de bacterias x tiempo de fermentación de la variable cafeína.

Cuadro 15. Análisis de varianza de cafeína, en función a los factores de la aplicación de bacterias, tiempo de fermentación e interacción entre aplicación de bacterias x tiempo de fermentación.

Fuentes de Variación	SC	GL	CM	F	p-valor	
Bloque	2,70E-04	2	1,40E-04	0,72	0,5034	ns
Aplicación de bacterias	1,30E-03	2	6,70E-04	3,51	0,0546	ns
Tiempo fermentación	1,30E-03	2	6,40E-04	3,33	0,0617	ns
Aplicación de bacterias *	5,70E-04	4	1,40E-04	0,75	0,5749	ns
Tiempo fermentación						
Error	3,10E-03	16	1,90E-04			
Total	0,01	26				
C.V.			6,50			

No se encontraron diferencias significativas en los tratamientos del contenido de cafeína para los factores aplicación de bacterias, tiempo de fermentación ni en la interacción entre aplicación de bacterias x tiempo de fermentación.

En el cuadro 15 se puede observar los resultados del porcentaje de cafeína, indicando que no existe diferencia estadística ya que se encuentran entre 0,2-0,24 %. Los factores aplicación de bacterias, tiempo de fermentación y la interacción entre aplicación de bacterias x tiempo de fermentación no actúan sobre la variable del alcaloide cafeína.

4.11. RELACIÓN TEOBROMINA/CAFEÍNA

En el ADEVA (cuadro 16), se muestran que existe diferencias estadísticas altamente significativas para el factor aplicación de bacterias, no se encuentran diferencias en el factor tiempo de fermentación, ni en la tiempo de fermentación de la variable relación teobromina/cafeína.

Cuadro 16. Análisis de varianza de la teobromina/cafeína, en función a los factores de la aplicación de bacterias, tiempo de fermentación e interacción entre aplicación de bacterias x el tiempo de fermentación.

Fuentes de Variación	SC	GL	CM	F	p-valor	
Bloque	0,13	2	0,07	0,18	0,8393	ns
Aplicación de bacterias	16,42	2	8,21	22,25	<0,0001	**
a2 vs a0 , a1	7,02	1	7,02	19,02	0,0005	**
a0 vs a1	9,4	1	9,4	25,48	0,0001	**
Tiempo fermentación	2,29	2	1,14	3,1	0,0729	ns
Aplicación de bacterias *	0,57	4	0,14	0,38	0,8167	ns
Tiempo fermentación						
Error	5,91	16	0,37			
Total	25,31	26				
C.V.				6,66		

Se encontraron diferencias altamente significativas para el factor aplicación de bacterias así como en las comparaciones entre a2 vs. a0, a1, y a0 vs. a1; pero no se encontró diferencia significativas para el factor tiempo de fermentación, ni para la interacción aplicación de bacterias x tiempo de fermentación.

En la figura 15 (a), se muestran diferencias estadísticas significativas para el factor de aplicación de bacterias, así como la comparación entre a2 vs. a0, a1, para la variable de relación teobromina/cafeína de las almendras de cacao. Se pudo observar que existió diferencia significativa en la relación teobromina/cafeína de las almendras con 9,84, lo que indica que al utilizar las bacterias *Lactobacillus fermentum* + *Acetobacter aceti*, obtenemos una mayor relación teobromina/cafeína, que al utilizarlas por separado.

En la figura 15 (b), se muestran diferencias estadísticas significativas para el factor de aplicación de bacterias, así como la comparación entre a0 vs. a1, para la variable relación teobromina/cafeína de las almendras de cacao. Se pudo observar que existió diferencia significativa en la relación teobromina/cafeína de las almendras con 8,03, lo que indica que al utilizar las bacterias ácido lácticas

(*Lactobacillus fermentum*) obtenemos una menor relación teobromina/cafeína, que al utilizar bacterias ácido acéticas (*Acetobacter aceti*).

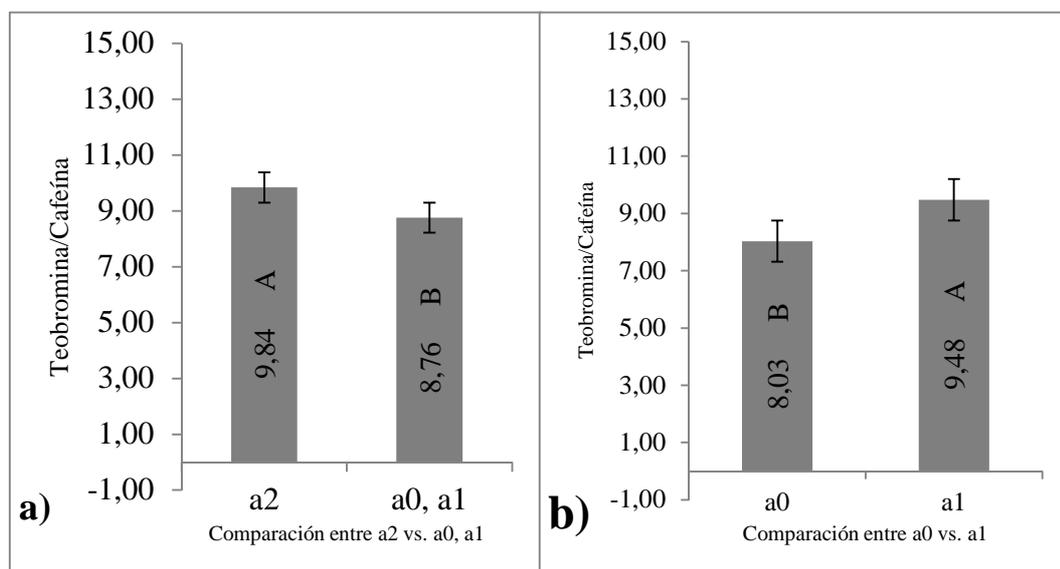


Figura 15. Relación de teobromina/cafeína de las almendras de cacao entre comparaciones de a2 vs. a0, a1 (a), y a0 vs. a1 (b)

4.12. POLIFENOLES

En el ADEVA (cuadro 17), se muestran que existe diferencias estadísticas significativas para el factor aplicación de bacterias, tiempo de fermentación, pero no se encuentran diferencias en la interacción aplicación de bacterias x tiempo de fermentación de la variable relación polifenoles.

Cuadro 17. Análisis de varianza de polifenoles, en función a los factores de la aplicación de bacterias, tiempo de fermentación e interacción entre aplicación de bacterias x el tiempo de fermentación.

Fuentes de Variación	SC	GL	CM	F	p-valor	
Bloque	599,13	2	299,57	22,86	<0,0001	**
Aplicación de bacterias	450,84	2	225,42	17,2	0,0001	**
a2 vs a0 , a1	99,01	1	99,01	7,56	0,0143	*
a0 vs a1	351,83	1	351,83	26,85	0,0001	**
Tiempo fermentación	535,65	2	267,83	20,44	<0,0001	**
Lineal	521,54	1	521,54	39,8	<0,0001	**
Cuadrática	14,12	1	14,12	1,08	0,3147	ns
Aplicación de bacterias *	58,84	4	14,71	1,12	0,3805	ns
Tiempo fermentación						
Error	209,64	16	13,1			
Total	1854,11	26				
C.V.			4,64			

Se encontraron diferencias altamente significativas para el factor aplicación de bacterias así como en las comparaciones entre a2 vs. a0, a1, y a0 vs. a1; también se encontró diferencia altamente significativas en el factor tiempo de fermentación con tendencia lineal, pero no hubo diferencia significativa en la interacción aplicación de bacterias x tiempo de fermentación.

En la figura 16 (a), se muestran diferencias estadísticas significativas para el factor de aplicación de bacterias, así como la comparación entre a2 vs. a0, a1, para la variable de polifenoles de las almendras de cacao. Se puede observar que existió diferencia significativa en la concentración de polifenoles en las almendras con 80,71 (mg Ac. Gálico/g muestra desengrasada), lo que indica que al utilizar las bacterias *Lactobacillus fermentum* + *Acetobacter aceti*, obtenemos una mayor concentración de polifenoles, que al utilizarlas por separado.

En la figura 16 (b), se muestran diferencias estadísticas significativas para el factor de aplicación de bacterias, así como la comparación entre a0 vs. a1, para la variable polifenoles de las almendras de cacao. Se puede observar que existió diferencia significativa en la concentración de polifenoles de las almendras con 81,06

(mg Ac. Gálico/g muestra desengrasada), lo que indica que al utilizar las bacterias ácido lácticas (*Lactobacillus fermentum*) obtenemos una menor concentración de polifenoles, que al utilizar bacterias ácido acéticas (*Acetobacter aceti*).

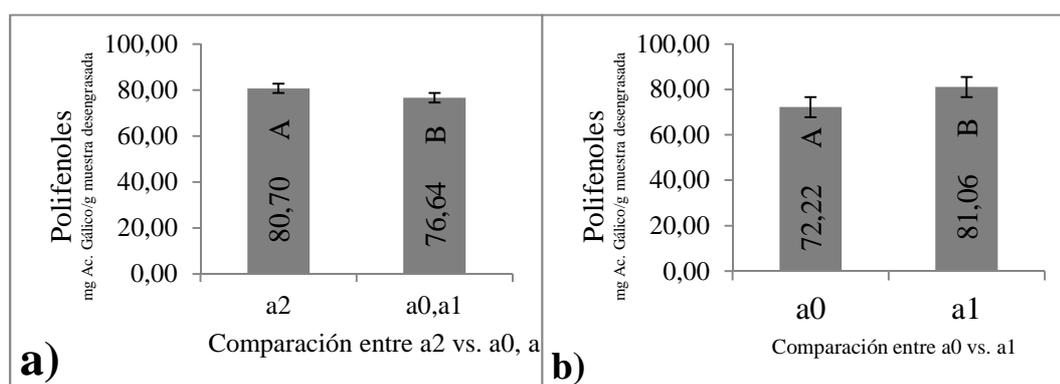


Figura 16. Polifenoles (mg Ac. Gálico/g muestra desengrasada) de las almendras de cacao entre comparaciones de a2 vs. a0, a1 (a), y a0 vs. a1 (b)

En la figura 17, se muestran la línea de tendencia para el factor tiempo de fermentación, para la variable de polifenoles de las almendras de cacao. Se puede observar que la concentración de polifenoles de las almendras, va en forma descendente en relación al tiempo de fermentación, esto quiere decir que mientras más tiempo pase más bajo es el porcentaje de teobromina de las almendras de cacao.

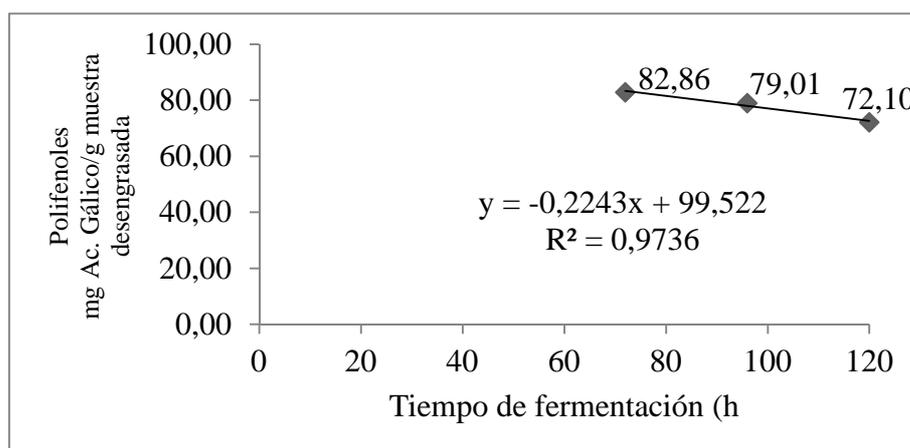


Figura 17. Concentración de polifenoles de las almendras de cacao en función al factor tiempo de fermentación.

V. DISCUSION

5.1. TEMPERATURA DE LA MASA DE CACAO EN FERMENTACIÓN

En cuanto a la variable temperatura de la masa fermentable existieron diferencias estadísticas significativas a las 48 h de fermentación entre los tratamientos por la aplicación de la bacteria *Lactobacillus fermentum* a las 24 horas de después de la cosecha. La temperatura máxima que alcanzaron todos los tratamientos fue al tercer día con una temperatura de 45 °C, lo que coincide con la investigación de (Bustamante & Ramírez, 2010), quien tuvo resultados similares indicado que al cuarto día, se alcanza temperaturas de 40 a 50 °C.

Los resultados obtenidos muestran que al cuarto día la temperatura empieza a disminuir llegando al quinto día a 42 °C, lo cual nos indica que la almendra siguió un buen proceso de fermentación, coincidiendo con (AGROCALIDAD, 2012) quien señala que la fermentación termina cuando empieza a descender la temperatura. En la presente investigación al tercer día de fermentación alcanzamos la temperatura máxima de 45 °C, coincidiendo con (Saltos, 2005) quien menciona que al tercer día de fermentación las temperaturas alcanzan entre los 40 y 50 °C y considera que el embrión muere.

5.2. PESO DE LAS ALMENDRAS DE CACAO AL FINAL DE LA FERMENTACIÓN

Los promedios del peso de almendras al final de la fermentación de cada tratamiento en cuanto a los factores de tiempo de fermentación, presentaron significancia, se obtuvieron resultados de pérdida de humedad al tercer día de fermentación del 29,07 %, al cuarto día del 32,19 %, y al quinto día del 35 %, lo cual contradice (Graziani De Fariña, Portillo, & Betancourt, 2005) quienes mencionan que después de la fermentación, las almendras tienen alrededor del 55 % de humedad, que al comparar este porcentaje con el obtenido en la investigación surge

una diferencia significativa, posiblemente utilizo otros métodos de fermentación o más días de proceso.

5.3. PESO DE LAS ALMENDRAS DE CACAO AL FINAL DEL SECADO

Los promedios del peso de las almendras de cacao al final del secado (7 % humedad) de cada uno de los tratamientos en cuanto a los factores de aplicación de bacterias, tiempo de fermentación e interacción entre aplicación de bacterias x tiempo de fermentación, no presentaron significancia para la variable, el cual tuvo una merma de 3,1:1, es decir que de 68 kg de almendras de cacao frescas se obtuvo un promedio entre 22-22,6 kg de almendras de cacao fermentadas y secas, lo cual (Amores, Jiménez, & Saltos, 2007), quienes mencionan que los métodos de fermentación, no originan cambios en el peso de las almendras para el cacao CCN51.

5.4. INDICE DE SEMILLA

Con respecto a la variable Índice de Semilla no hubo diferencia entre los factores de aplicación de bacterias, tiempo de fermentación o interacción entre aplicación de bacterias x tiempo de fermentación. El Índice de Semilla del ensayo se encontró entre 144,27- 149,04 g superior al grano requerido por la (NTE INEN 176, 2000) que es de 135-140 g. Es importante considerar que las almendras de cacao del ensayo fue de una plantación que lleva un manejo adecuado de fitosanitarios y fertilización del cultivo, además las cosechas para la investigación fueron a finales de la época lluviosa, lo cual coincide con el estudio de (Bustamante & Ramírez, 2010) quienes concluyeron que el peso de 100 granos, evaluado durante las distintas épocas son diferentes, determinando que el mayor peso de las almendras existe durante la época lluviosa, al compararse con la época seca. De igual manera (Bustamante y Lainez 2010), citado por (Bustamante & Ramírez, 2010) mencionan que el peso del cacao depende directamente de la nutrición de la planta y disponibilidad de agua.

Los promedios del índice de semilla al final del secado (7 % humedad) de cada uno de los tratamientos en cuanto a los factores de aplicación de bacterias, tiempo de fermentación e interacción entre aplicación de bacterias x tiempo de fermentación, no presentaron significancia para la variable, lo cual (Amores, Jiménez, & Saltos, 2007), quienes confirman que los métodos de fermentación, no promueven cambios en la variable del peso de 100 almendras para el cacao CCN-51.

5.5. GRADO DE FERMENTACIÓN

(De Vuyst, Lefeber, Papalexandratou, Camu, 2010., Lefeber, Janssens, Camu, De Vuyst, 2010) citado por (Lefeber, Janssens, Moens, Gobert, & De Vuyst, 2011), indican que las bacterias ácido lácticas forman el enlace entre el etanol producido por las levaduras y el ácido acético producido por las bacterias ácido acéticas, contribuyendo al desarrollo de un cacao de alta calidad. Estos mismos autores mencionan que al utilizar bacterias ácido lácticas (*Lactobacillus fermentum*), como cultivos iniciadores en la fermentación, se obtiene granos de cacao secos bien fermentados. Corroborando con el presente estudio ya que la aplicación de *Lactobacillus fermentum* tiene diferencia significativa comparando con la aplicación de *Acetobacter aceti* en el grado de fermentación.

El presente estudio muestra una diferencia significativa al aplicar bacterias ácido lácticas (*Lactobacillus fermentum*) a las 24 horas y bacterias ácido acéticas (*Acetobacter aceti*) a las 48 horas después de la cosecha, se obtiene resultados favorables para un mayor porcentaje de grado de fermentación de las almendras de cacao, lo que no coincide con (Schwan, Article, 1998) en el primer informe de uso de un cultivo iniciador mixto definido para la fermentación de cacao de Brasil. El cóctel definido fue una levadura (*Saccharomyces cerevisiae* var. *chevalieri*), dos bacterias ácido lácticas (*Lactobacillus lactis* y *Lactobacillus plantarum*), y dos bacterias del ácido acéticas (*Acetobacter aceti* y *Gluconobacter oxydans* subsp. *suboxydans*), parte del estudio consistió de una adición por fases, al inicio de la fermentación se inoculo la levadura, seguido por la inoculación de las bacterias ácido lácticas a las 24 horas, y finalmente la inoculación de las bacterias ácido acéticas añadidas a las 48

horas, lo que obtuvo como resultado fue significativamente inferior, ya que sólo el 90 % de los granos fueron totalmente fermentados después de 7 días. Sin embargo en el mismo estudio reveló diferencias significativas en los resultados de las fermentaciones inoculado el coctel definido de microorganismos al inicio de la fermentación indicando que toman 6 a 7 días llegar a un 93 y 97 % respectivamente de almendras secas bien fermentadas.

(Enríquez, 2010) Menciona que el tiempo de fermentación para el cacao CCN-51 en cajas es de 5-6 días. Lo que corrobora (Jordán , 2013) demostrando que con cinco días de fermentación con una frecuencia de volteo a las 48, 72 y 96 horas iniciada la fermentación en cajas de laurel se obtiene 76 % de granos de buena y ligera fermentación, y el 24 % de granos deficientes (violeta, pizarroso y moho). El presente estudio demuestra que con la utilización de bacterias ácido lácticas (*Lactobacillus fermentum*), bacterias ácido acéticas (*Acetobacter aceti*), o la combinación de estos dos microorganismos aceleramos el proceso de fermentación, ya que al tercer día obtuvimos un 76 % de almendras fermentadas, 18 % de granos violetas y 6 % de granos pastosos, es decir que se encuentra dentro del rango que exige el (NTE INEN 176, 2000) para exportación de cacao CCN-51 que es de 76 % de almendras fermentadas.

Por otra parte, (Villavicencio, 2001) indica que el clon CCN-51 al cuarto día de fermentación casi no tiene almendras pizarrosas, el pico máximo de almendras violetas se presenta en el día quinto de la fermentación con 62 %, también añade que al séptimo día de fermentación obtuvo más del 80 % de almendras fermentadas. Lo que en el tercer día de fermentación se obtuvo el 80 % de almendras fermentadas en la investigación aplicando *Lactobacillus fermentum* + *Acetobacter aceti*, y al quinto día se obtuvo 86 % de almendras fermentadas. Pero (Díaz & Pinoargote, 2012) y (Navia & Pazmiño, 2012) con fermentaciones tradicionales obtuvieron el 90 % y 92 % de almendras fermentadas de cacao CCN-51 respectivamente, al quinto día de fermentación en cajas de laurel.

En la investigación el grado de fermentación, es proporcional al tiempo de fermentación, esto quiere decir que mientras más tiempo de fermentación mayor es el grado de fermentación de las almendras de cacao. Lo que concuerda con investigaciones realizadas por (Amores F. , 2006) en la influencia del número de días de fermentación sobre el porcentaje total de almendras fermentadas, almendras violetas y almendras pizarras en muestras del clon comercial CCN-51

5.6. CONTENIDO DE GRASA

Los promedios del contenido de grasa para cada uno de los tratamientos en cuanto a los factores de aplicación de bacterias, tiempo de fermentación e interacción entre aplicación de bacterias x tiempo de fermentación, resultado estadísticamente similar para la variable, es decir no hubo diferencia significativa, el porcentaje de grasa en la presente investigación se encontró entre 47,04- 49,5 %, lo cual nos da resultados inferiores al porcentaje que menciona (Cedeño; 2004), citado por (Bustamante & Ramírez, 2010). para la variedad CCN-51, ya que debería tener un alto porcentaje de grasa del 54 %, que es una característica de esta variedad lo que lo hace muy cotizado por las industrias.

En un estudio realizado por (Villavicencio, 2001), los resultados para la variedad CCN-51 de contenido de grasa fueron de 48,23 %, similares a los obtenidos en la presente investigación que se encontraron entre 47,04- 49,5 %. Por otra parte (Enriquez, 1994) menciona que el tipo de cacao Forastero tiene un porcentaje de grasa de más del 52 %, mientras que el cacao fino o de aroma tiene un porcentaje inferior al 50 %.

5.7. POTENCIAL DE HIDROGENO (pH)

El presente estudio muestra una diferencia significativa al aplicar bacterias ácido lácticas (*Lactobacillus fermentum*) a las 24 horas y bacterias ácido acéticas (*Acetobacter aceti*) a las 48 horas después de la cosecha, se obtiene resultados con menor pH (5,36) de las almendras de cacao, en comparación, cuando se utiliza por

separado. Además en el presente estudio se obtuvo valores altos de pH (5,42) solo con la aplicación de *Lactobacillus fermentum*, teniendo diferencia significativa comparando con la aplicación de *Acetobacter aceti* teniendo valores de pH más bajos (5,39). (Jinap y Dimick, 1990), citado por (Villavicencio, 2001) indican que grupos de cacaos de bajo pH, contiene altos niveles de ácido láctico y acético, mientras que en el caso del grupo con alto pH, las concentraciones de estos ácidos es menor, esto le permitió determinar que la difusión de los ácidos orgánicos, principalmente el ácido acético, hacia el cotiledón influyen principalmente sobre el pH de una muestra de cacao. Con lo anteriormente mencionado al aplicar BAL y BAA a los tratamientos obtendremos valores bajos de pH en las almendras de cacao fermentadas y secas, ya que el *Lactobacillus fermentum* fermentan glucosa a ácido láctico y ácido acético (Lefeber, Janssens, Moens, Gobert, & De Vuyst, 2011), y el *Acetobacter aceti* oxida etanol en ácido acético (Papalexandratou, y otros, 2011).

El pH es inversamente proporcional al tiempo de fermentación, es decir cuando menor es el tiempo de fermentación mayor es el pH, luego a medida que pasa el tiempo de fermentación disminuye el pH. (Villavicencio, 2001) En su estudio obtuvo resultados con el mismo comportamiento en cacao CCN 51 pero al quinto día empieza a aumentar el pH.

En la presente investigación al tercer día de fermentación presento un valor de pH 5,66, y va disminuyendo hasta el quinto día llegando a un valor de pH 5,04, mientras (Villavicencio, 2001) en su estudio realizado en cacao CCN 51, menciona que esta variedad al tercer día presenta un pH con valor de 6,15 y va disminuyendo hasta el quinto día llegando a un valor de pH 5,19, y luego empieza a aumentar.

(Sánchez, 2007) Indica que el pH óptimo para un cacao de calidad, debe encontrarse en un rango de 5,1 a 5,4 después del secado, en la investigación los tratamientos T3, T5 y T8 tienen valores promedios de pH de 5,31; 5,4 y 5,32 respectivamente, lo que significa que estos tratamientos se los clasifica como un grupo de cacao de calidad.

5.8. ACIDEZ TITULABLE

El presente estudio muestra una diferencia significativa al aplicar bacterias ácido lácticas (*Lactobacillus fermentum*) a las 24 horas y bacterias ácido acéticas (*Acetobacter aceti*) a las 48 horas después de la cosecha, se obtiene resultados con mayor acidez titulable de las almendras de cacao, en comparación con cuando se utiliza por separado, no existe bibliografía sobre la influencia de la aplicación de microorganismos en la acidez titulable de las almendras de cacao. Pero (Armijos, 2002) menciona que el ácido orgánico de mayor contenido en el cacao es el ácido acético como representante de los ácidos volátiles, al cual se le atribuye la mayor acidez titulable a los tratamientos que se les aplicó las BAL y BAA, ya que el *Lactobacillus fermentum* fermenta glucosa a ácido acético (Lefeber, Janssens, Moens, Gobert, & De Vuyst, 2011), y el *Acetobacter aceti* oxida etanol en ácido acético (Papalexandratou, y otros, 2011).

El comportamiento de la acidez titulable en función al tiempo fue similar, ya que cuando es menor el tiempo de fermentación es menor la acidez, luego a medida que pasa el tiempo de fermentación aumenta la acidez titulable. (Villavicencio, 2001) En su estudio obtuvo resultados con el mismo comportamiento en cacao CCN 51 pero al quinto día empieza a disminuir, este mismo autor menciona que este comportamiento es lógico debido a que durante la fermentación se produce el ingreso de ácido acético al interior del cotiledón, cuando hay un exceso de fermentación el contenido de ácido acético disminuye porque existe una putrefacción del cotiledón; pero (Recalde, 2007) tuvo otro comportamiento las almendras de cacao CCN-51 tienen un ascenso de la concentración de ácidos volátiles en el día tres de fermentación, luego disminuye en el día cuatro y vuelve a subir, llegando a su máxima concentración en el día quinto.

La acidez titulable para el tercer día de fermentación presentó un valor 0,6 [mlNa(OH) 0,1 N/g], y va en forma ascendente hasta el quinto día llegando a un valor de 0,82 [mlNa(OH) 0,1 N/g], mientras (Villavicencio, 2001) en su estudio realizado en cacao CCN 51, menciona que esta variedad al tercer día presenta un valor 0,744 [mlNa(OH) 0,1 N/g] y va en forma ascendente hasta el quinto día

llegando a un valor de 1,188 [mlNa(OH) 0,1 N/g], y luego empieza a descender. Por otra parte (Recalde, 2007) obtuvo resultados diferentes al tercer día tuvo una acidez titulable de 0,7 [mlNa(OH) 0,1 N/g], al cuarto disminuyó a 0,64 [mlNa(OH) 0,1 N/g], y al quinto día aumentó su acidez a 0,74 [mlNa(OH) 0,1 N/g].

Los valores de acidez titulable registrados en la presente investigación de las almendras fermentadas y secas se observa que la acidez titulable y el pH tienen una relación inversamente proporcional lo cual es lógico, es decir cuando mayor sea el tiempo de fermentación, aumenta la acidez titulable, ya que se requieren más ml de NaOH 0.1 N, para neutralizar los valores de pH en descenso

5.9. TEOBROMINA

El presente estudio muestra una diferencia significativa al aplicar bacterias ácido lácticas (*Lactobacillus fermentum*) a las 24 horas y bacterias ácido acéticas (*Acetobacter aceti*) a las 48 horas después de la cosecha, se obtiene resultados con mayor porcentaje de teobromina de 2,06 en las almendras de cacao, en comparación con cuando se utiliza por separado, y cuando se utiliza únicamente la bacterias *Lactobacillus fermentum* el porcentaje es de 1,78, no existe bibliografía sobre la influencia de la aplicación de microorganismos en el porcentaje de teobromina en las almendras de cacao. Por otra parte (Recalde, 2007) menciona que la teobromina empieza con un porcentaje alto de 2,08 % al inicio de la fermentación y va disminuyendo conforme aumenta el tiempo de fermentación llegando a 1,86 % en el cacao CCN-51, lo cual concuerda con nuestra investigación que la teobromina es inversamente proporcional al tiempo de fermentación, es decir que al tercer día de fermentación se obtuvo un porcentaje mayor de teobromina 2,10 % y conforme transcurre el tiempo de fermentación disminuye el porcentaje de teobromina, así teniendo al quinto día un valor de 1,81% de teobromina. De igual forma indica (Wakao, 2002) en su estudio que el porcentaje de teobromina disminuye a mayor tiempo de fermentación.

Los valores que se obtuvieron en la investigación son bajos para el cacao CCN-51 aplicando *Lactobacillus fermentum* mas *Acetobacter aceti*, y mucho menor aplicando unicamente *Lactobacillus fermentum* en comparación, con la recopilación de información de (Amores, Palacios, Jiménez, & Zhang, 2009) menciona que el promedio de los porcentajes de teobromina de Ghana, Costa de Marfil y Nigeria, países cuya producción representan más del 60 % de la producción mundial de cacao, y que son considerados como productores de cacao corriente, es de 3,12 %, 2,92 % y 3,02 %, respectivamente; y los promedios para Venezuela y Papúa Nueva Guinea, que son dos importantes proveedores en el nicho de los cacaos finos, son de 2,70 % y 2,14 % respectivamente; siendo esto que, con la aplicación de *Lactobacillus fermentum* al cuarto y quinto día de fermentación tenemos los porcentajes más bajos de teobromina, 1,66 y 1,73 % respectivamente.

5.10. CAFEÍNA

Los promedios del porcentaje de cafeína para cada uno de los tratamientos en cuanto a los factores de aplicación de bacterias, tiempo de fermentación e interacción entre aplicación de bacterias x tiempo de fermentación, resultado estadísticamente similar para la variable, es decir no hubo deferencia significativa, el porcentaje de cafeína presente en la investigación se encontró entre 0,20-0,24 %, además los resultados obtenidos son inferiores al porcentaje que menciona (Recalde, 2007) para la variedad CCN-51, ya que debería tener un alto porcentaje de cafeína entre el tercer y quinto día de fermentación 2,26 a 2,28%, que es una característica de esta variedad.

Los porcentajes obtenidos en la presente investigación no guardan consistencia con un estudio anterior como cita (Amores, Palacios, Jiménez, & Zhang, 2009) que el promedio de 0,46 % encontrado en varios lotes de cacao ecuatoriano exportado como cacao fino aromático. (Amores, Palacios, Jiménez, & Zhang, 2009) recopila información de los promedios de cafeína para Ghana, Costa de Marfil y Nigeria señalando 0,24 %, 0,27 % y 0,22 % respectivamente, y son valores similares al de la investigación; además estos valores son considerablemente inferiores a promedios de

muestras de Ecuador también son inferiores a los promedios de Venezuela y Papúa Nueva Guinea, señalando valores de 0,68 % y 0,43 % para los cacaos finos.

5.11. RELACIÓN TEOBROMINA/CAFEÍNA

El presente estudio muestra una diferencia significativa al aplicar bacterias ácido lácticas (*Lactobacillus fermentum*) a las 24 horas y bacterias ácido acéticas (*Acetobacter aceti*) a las 48 horas después de la cosecha, se obtiene resultados con mayor relación teobromina/caffeína de 9,84 en las almendras de cacao, en comparación con cuando se utiliza por separado, y cuando se utiliza únicamente la bacterias *Lactobacillus fermentum* la relación teobromina/caffeína es de 8,03, no existe bibliografía sobre la influencia de la aplicación de microorganismos en la relación teobromina/caffeína en las almendras de cacao. Por otra parte Los resultados de un estudio conducido por (Hasing, 2004) menciona de manera general, el rango para la relación teobromina/caffeína para los cacaos aromáticos (cacao criollo) es de 2,00 a 1,00; para cacao trinitario es de 10,00 a 5,00; mientras más altos son valores para la relación teobromina/caffeína, están asociados con orígenes de una menor calidad aromática, es decir si esta relación se acerca o superan la cifra de 10,00, corresponde a orígenes considerados como cacao forasteros o corriente. (Amores, Palacios, Jiménez, & Zhang, 2009) indica que los orígenes de Ghana, Costa de Marfil y Nigeria tienen valores que caen en el rango de 10,8 a 14,2 para esta relación; en cambio aquellos para la relación teobromina/caffeína correspondiente a los orígenes Venezuela, República Dominicana, Papúa Nueva Guinea y Trinidad y Tobago, son de 4,0; 4,9; 5,0; y 4,4 como promedios para cacao finos aromáticos.

5.12. POLIFENOLES

El presente estudio muestra una diferencia significativa al aplicar bacterias ácido lácticas (*Lactobacillus fermentum*) a las 24 horas y bacterias ácido acéticas (*Acetobacter aceti*) a las 48 horas después de la cosecha, se obtiene resultados con mayor concentración de polifenoles en las almendras de cacao, en comparación con cuando se utiliza por separado, no existe bibliografía sobre la influencia de la

aplicación de microorganismos en la concentración de polifenoles en las almendras de cacao.

(Recalde, 2007) En su estudio demuestra que los polifenoles disminuyen por efecto de del tiempo de fermentación desde el inicio al final de la fermentación de las almendras de cacao, en nuestro estudio también tiene la misma tendencia de bajar la concentración de polifenoles a medida q aumenta el tiempo de fermentación. En cambio (Recalde, 2007) al tercer día de fermentación tuvo valores 46,17 (mg Ac. Gálico/g muestra desengrasada) y disminuyo al quinto día a 43,93 (mg Ac. Gálico/g muestra desengrasada), lo que en el presente trabajo dio valores totalmente diferentes, dando al tercer día 82,86 (mg Ac. Gálico/g muestra desengrasada), y disminuyo al quinto día a 72,10 (mg Ac. Gálico/g muestra desengrasada).

VI. CONCLUSIONES

El efecto de las bacterias utilizadas en este ensayo determinó la disminución de alcaloides, específicamente de la relación teobromina/cafeína el valor obtenido fue de 8,3, que lo ubica en el grupo de cacaos de calidad, ya que el valor asignado para cacaos corrientes es de 10 a 15.

La aplicación de estas bacterias en la masa fermentable no influye en el peso de las almendras al final del secado, ya que el peso está en función de la genética, condiciones climáticas, estado fitosanitario de la planta, fertilidad del suelo.

Con la utilización de *Lactobacillus fermentum* más *Acetobacter aceti*, se obtuvo al cuarto día de fermentación un pH de 5,32, que lo ubica dentro del rango de cacaos de calidad, los mismos que deben estar en rangos de 5,1 a 5,4 después del beneficio.

La aplicación de *Lactobacillus fermentum* más *Acetobacter aceti*, disminuyó el tiempo de fermentación a tres días, para alcanzar el porcentaje óptimo de fermentación para la exportación exigido por la (NTE INEN 176, 2000) que es de 76 % de almendras fermentadas.

Este proceso permitió obtener valores de 16 % de almendras violetas y 4 % de almendras pastosas. Los valores mínimos exigidos por la (NTE INEN 176, 2000) son 18 % y 5 % respectivamente.

Los factores en estudio influyeron positivamente sobre la calidad de las almendras de cacao. Una fermentación en condiciones controladas con microorganismos permite obtener almendras de buena calidad física-química y características homogéneas.

VII. RECOMENDACIONES

En base a lo evaluado en la fase de campo se recomienda utilizar *Lactobacillus fermentum* más *Acetobacter aceti* a una concentración de 10^8 UFC/g, para alcanzar a los tres días de fermentación el 80 % de granos fermentados y a partir del cuarto día un pH de 5,32 que es el rango determinado para cacaos de calidad.

Se recomienda que antes de la inoculación de las bacterias a la masa fermentable de cacao se introduzcan los envases que contienen el inóculo bacteriano en los cajones de almendras, esto para que el caldo bacteriano tome la temperatura del medio al cual va a ser aplicado.

Para un buen proceso de fermentación se debe utilizar cajones de madera con orificios de 2 cm de diámetro en la parte inferior, para tener un drenaje del mucilago de las almendras de cacao más eficiente.

Se recomienda para futuras investigaciones, probar distintas dosificaciones de las bacterias recomendadas, y analizar posibles resultados esperados de cómo influyen estas en los procesos de calidad.

Se recomienda analizar diferentes tiempos de fermentación, que podrían ser más extensos para determinar así el grado de afectación a la calidad de las almendras.

Recomendamos probar otros métodos de fermentación tales como sacos o montones, que son los métodos comúnmente utilizados por los productores .

VIII. BIBLIOGRAFÍA

- AGROCALIDAD. (2012). Agencia Ecuatoriana de Aseguramiento de la Calidad del Agro. Guía de buenas prácticas agrícolas para cacao. MAGAP, Ministerio de Agricultura, Ganadería, Acuacultura y Pesca, Subproceso de Sistemas de Gestión de Inocuidad, Inocuidad de los Alimentos. CreatiBros Ecuador.
- Amores, E., Jiménez, J., & Saltos, A. (2007). Comportamiento del perfil organoléptico de los cacaos CCN 51 y Nacional en respuesta a la introducción del pre-secado de las almendras en el protocolo de fermentación. Convenio INIAP, APROCAFA, CORPEI, Estación Experimental Tropical Pichilingue, Quevedo.
- Amores, F. (2006). Proyecto para establecer parametros fisicos, quimicos y organolepticos que permitan diferenciar entre cacao fino y ordinario. Taller Internacional para presentacion de resultados, INIAP, Guayaquil.
- Amores, F., Palacios, A., Jiménez, J., & Zhang, D. (2009). Entorno ambiental, genética, atributos de calidad y singularización del cacao en el Nor Oriente de la Provincia de Esmeraldas. Boletín Técnico N° 135, INIAP, Instituto Nacional Autónomo de Investigaciones Agropecuarias-Estación Experimental Tropical Pichilingue, SENACYT, Secretaría Nacional de Ciencia y Tecnología, APROCANE, Asociación de Productores de Cacao de la Zona Norte de Esmeraldas, USDA, United States Department of Agriculture, Quevedo.
- Andrade, M. (2013). Evaluación de la viabilidad del uso de *Lactobacillus acidophilus* LA-5 en la elaboración de helados. Trabajo de graduación, Universidad del Azuay, Facultad de Ciencia y Tecnología, Escuela de Ingeniería en alimentos, Cuenca.
- Armijos, A. (2002). Características de la acidez como parámetro químico de calidad en muestras de cacao (*Theobroma cacao* L.) fino y ordinario de producción Nacional durante la fermentación. Tesis de licenciatura en química especialización química analítica, Pontificia Universidad Católica del Ecuador, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Departamento de Ciencias Químicas, Quito.

- Arroyo, J. (2010). Efecto de fermentadores y tipos de fermentación sobre la calidad de cacao Nacional en tres localidades de la Provincia de Esmeraldas. Tesis de grado, Universidad Técnica de Manabí, Facultad de Ingeniería Agronómica, Santa Ana-Manabí.
- BCE. (2013). Banco Central del Ecuador. Programa de encuestas de coyuntura, sector agropecuario. Publicaciones económicas, No. AG. 86-II-2013.
- BCE. (2015). Banco Central del Ecuador. Evolución de la balanza comercial, enero-diciembre 2014. Dirección Nacional de Síntesis Macroeconómicas, Subgerencia de Programación y Regulación.
- Benitez, L. (2001). Diseño de una maquina secadora para la obtención de pimienta negra. Escuela Politécnica Nacional del Ecuador, Tesis de Ingeniero Mecánico. Quito: p. 54.
- Braudeau, J. (1970). El Cacao. Barcelona, España: Blumé traducido por: Hernández, C. p. 185-234.
- Bravo, N., & Mingo, F. (2011). Valoración de tres métodos de fermentación y secado para mejorar la calidad y rentabilidad del cacao fino de aroma (*Theobroma cacao* L.) en la parroquia Panguintza del Cantón Centinela del Cóndor, Provincia de Zamora Chinchipe. Tesis de grado, Universidad Nacional de Loja, Carrera de Ingeniería Agrícola, Área Agropecuaria y de recursos naturales renovables, Loja.
- Bustamante, M., & Ramírez, A. (2010). Efecto de varios métodos de prefermentación y fermentación del cacao CCN-51 (*Theobroma cacao* L) en las propiedades físicas y organolépticas de la almendra. Tesis de Grado, Universidad Católica de Santiago de Guayaquil, Facultad de Educación Técnica para el Desarrollo, Carrera de Ingeniería Agropecuaria, Guayaquil.
- Calderón, L. (2002). Evaluación de los compuestos fenólicos del cacao (*Theobroma cacao* L.) de tipo fino y ordinario de producción Nacional durante la fermentación en relación a la calidad. Tesis de licenciatura en química especialización química analítica, Pontificia Universidad Católica del Ecuador, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Departamento de Ciencias Químicas, Quito.

- Campos, R. (2011). Estudio de factibilidad para la cadena productiva del cacao fino de aroma en la Provincia Santo Domingo de los Tsáchilas. Diplomado en Gestión y Elaboración de Proyectos, Instituto de Altos Estudios Nacionales, Escuela de Gobierno y Administración Pública, Quito.
- Camu, N., De Winter, T., Verbrugghe, K., Cleenwerck, I., Vandamme, P., Takrama, J., y otros. (2007). Dynamics and biodiversity of populations of lactic acid bacteria and acetic acid bacteria involved in spontaneous heap fermentation of cocoa beans in Ghana. Vrije Universiteit Brussel, IMDO, Research Group of Industrial Microbiology and Food Biotechnology. Brussels, Belgium: American society for microbiology, Applied and environmental microbiology. Article Vol. 73, No 6, p. 1809–1824.
- Carrión, J. (2012). Estudio de factibilidad para la producción y comercialización de cacao (*Theobroma cacao* L.) variedad CCN-51, Jama-Manabí. Tesis de grado, Universidad San Francisco de Quito, Colegio de Agricultura, Alimentos y Nutrición, Ingeniería en Agroempresas, Quito.
- CATIE. (1982). Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza. Informe de la situación actual, perspectivas del cultivo e industrialización del cacao en Centroamérica. Banco centroamericano de integración económica, Departamento de Producción Vegetal. Turrialba, Costa Rica: p. 61.
- Cleenwerck, I., Camu, N., Engelbeen, K., De Winter, T., Vandemeulebroecke, K., De Vos, P., y otros. (2007). *Acetobacter ghanensis* sp. nov., a novel acetic acid bacterium isolated from traditional heap fermentations of Ghanaian cocoa beans. Ghent University, Faculty of Sciences. Ghent, Belgium: International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. Vol. 57. p. 1647–1652.
- Contreras, C., Ortiz de Bertorelli, L., Graziani de Fariñas, L., & Parra, P. (2002). Fermentadores para cacao usados por los productores de la localidad de Cumboto. Venezuela: Agronomía Tropical. Vol. 54, No 2, p. 219-232.
- Cros, E. (2004). Factores condicionantes de la calidad del cacao. Francia: CIRAD – CP, Maison de la Technologie BP 5035, 34032 Montpellier Cedex 1.

- De Cazy, B., Drogué, S., Jacques, M., & Dehevel, S. (2000). El mejoramiento de la calidad del cacao ecuatoriano como factor de competitividad. En XIII Conferencia Internacional de cacao. Lagos: p. 117.
- De Cebra, J. (2004). Manejo y producción del cacao CCN-51. Tesis agrícola, Parroquia La Unión.
- Díaz, S., & Pinoargote, M. (2012). Análisis de las características organolépticas del chocolate a partir de cacao CCN-51 tratado enzimáticamente y tostado a diferentes temperaturas. Tesis de grado, Escuela Superior Politécnica del Litoral, Facultad de Ingeniería en Mecánica y Ciencias de la Producción, Ingeniería en Alimentos, Guayaquil.
- Enriquez, G. (1994). Breve definición del cacao fino y de aroma. ICCO, Londres.
- Enríquez, G. (1995). Beneficio del cacao. INIAP, Instituto Nacional Autónomo de Investigaciones Agropecuarias.
- Enríquez, G. (2003). El cultivo orgánico de cacao bajo el concepto de calidad total. Quevedo.
- Enríquez, G. (2004). Cacao orgánico: Guía para productores ecuatorianos. Manual No. 54, p. 39-294, INIAP, Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias, Quito.
- Enríquez, G. (2010). Cacao orgánico: Guía para productores ecuatorianos. Quito: 2da edición, p.407.
- FUNDACITE. (2005). Manejo del cacao: El cacao y su gente. Aragua, Venezuela. Obtenido de <http://www.cacao.fundacite.org.gov.ve/manejo.html>
- Gaibor, D. (2010). Efecto del diseño de la caja y tipo de madera utilizada, en el proceso fermentativo del grano de cacao (*Theobroma cacao* L.), canton las Naves, provincia de Bolivar. Tesis de grado, Universidad Estatal de Bolivar, Facultad de Ciencias Agropecuarias, Recursos Naturales y del Ambiente, Escuela de Tecnología e Ingeniería Agroindustrial, Guaranda.
- García, L. (2000). Grupos y variedades de cacao. Cultivo del cacao en la amazonía peruana. INIA, Instituto Nacional de Innovación Agraria, Lima, Perú.
- García, L. (2008). Caracterización del potencial genético del cacao en el Perú. Proyecto de cooperación UE-Perú en materia de asistencia técnica relativa al

- comercio-Apoyo al programa estratégico nacional de exportaciones (PENX 2003-2013). MINCETUR, Ministerio de Comercio Exterior y Turismo, Delegación de la Comisión Europea en el Perú, UE-Perú/PENX. Lima: 24/2007/PNRC/LOTE 1.
- Graziani De Fariña, L., Portillo, E., & Betancourt, E. (2005). Efectos de algunos factores pos-cosecha sobre la calidad sensorial del cacao. Venezuela.
- Hasing, M. (2004). Estudio de la variación en los contenidos de polifenoles y alcaloides, en almendras de cacao por efecto de los procesos de fermentación y tostado. Tesis de doctorado en bioquímica y farmacia, Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, Facultad de Ciencias, Escuela de Bioquímica y Farmacia, Riobamba, Ecuador.
- ICCO. (2003). Organización Internacional de Cacao. Caracterización de árboles superiores de cacao (*Theobroma cacao*). Seleccionados por el programa de mejoramiento genético del CATIE. CATIE, Centro Agronómico Tropical de Investigaciones y Enseñanzas, Programa de enseñanza para el desarrollo y la conservación. Escuela de postgrado.
- ICCO. (2013). International Cocoa Organization. Quarterly Bulletin of Cocoa Statistics. Vol. XXXXIX, No 2, Cocoa Year 2012/2013.
- ICCO. (2015). International Cocoa Organization. Quarterly bulletin of cocoa statistics. Vol. XLI, No. 1, Cocoa year 2014/15.
- INEC. (2013). Instituto Nacional de Estadística y Censos. Superficie, producción y ventas, según región y Provincia: Cacao (almendra seca). Ecuador en cifras, ESPAC, Encuesta de Superficie y Producción Agropecuaria Continua 2013.
- INIAP. (2010). Instituto Nacional Autónomo de investigaciones Agropecuarias. Manejo técnico del cultivo de cacao en Manabí. Manual No 75, INIAP, Estación Experimental Portoviejo.
- Jácome, M. (2010). Incidencia de la aplicación de tecnología de secado en el mejoramiento del valor agregado del cacao (*Theobroma cacao*) variedad CCN-51. Tesis de grado, Universidad Técnica de Ambato, Facultad de Ciencia de Ingeniería en Alimentos y Bioquímica. Carrera de Ingeniería en Alimentos, Ambato.

- Jimenez, C. (2000). Efecto de dos métodos de fermentación sobre la calidad de tres grupos de cacao *Theobroma cacao* L. cultivados en la zona de Quevedo Provincia de Los Ríos. Tesis de ingeniería, Universidad Estatal de Bolívar, Facultad de Ciencias Agropecuarias, Recursos Naturales y del Ambiente, Guaranda.
- Jordán , J. (2013). Analizar y Validar un Programa de Rehabilitación en la Poscosecha del Cacao CCN51, en la Finca Rami, en la Provincia de Los Ríos. Tesis de grado, Escuela Superior Politécnica del Litoral, Facultad de Ingeniería en Mecánica y Ciencias de la Producción, GUAYAQUIL.
- Laboratorios Britania. (2010). Medios de cultivo deshidratados. Caba, Argentina. Obtenido de <http://www.britanialab.com.ar>
- Laboratorios Conda. (2010). Medios de cultivo deshidratados microbiología. Madrid, España. Obtenido de <http://www.condalab.com.es>
- Lainez, J. (1959). Algunos estudios sobre el beneficio de algunas selecciones cultivadas en el Ecuador. Universidad de Guayaquil, Tesis Ingeniero Agronomo. Guayaquil: p. 4-16.
- Lefeber, T., Janssens, M., Camu, N., & De Vuyst, L. (2010). Kinetic analysis of strains of lactic acid bacteria and acetic acid bacteria in cocoa pulp simulation media toward development of a starter culture for cocoa bean fermentation. Vrije Universiteit Brussel, IMDO, Research Group of Industrial Microbiology and Food Biotechnology, Faculty of Sciences and Bio-engineering Sciences. Brussels, Belgium: American society for microbiology, Applied and environmental microbiology. Article Vol. 76, No. 23, p. 7708–7716.
- Lefeber, T., Janssens, M., Moens, F., Gobert, W., & De Vuyst, L. (2011). Interesting starter culture strains for controlled cocoa bean fermentation revealed by simulated cocoa pulp fermentations of cocoa-specific lactic acid bacteria. Vrije Universiteit Brussel, IMDO, Research Group of Industrial Microbiology and Food Biotechnology, Faculty of Sciences and Bio-engineering Sciences. Brussels, Belgium: American Society for

- Microbiology, Applied and Environmental Microbiology. Article, Vol. 77, No 18. p. 6694–6698.
- Luna, L. (2013). El cacao en el Ecuador. Guayaqui: En homenaje a la cumbre mundial del cacao. Boletín 56.
- Manual de Productos Básicos. (1991). Cacao fino de aroma: Estudio de la producción y el comercio mundial. Centro de Comercio Interno. Ginebra: UNCTAD/GATT. p. 60.
- Microbiologics. (2015). Certificate of analysis: Lyophilized microorganism specification and performance upon release. ATCC, American Type Culture Collection.
- Navia, A., & Pazmiño, N. (2012). Mejoramiento de las características sensoriales del cacao CCN-51 a través de la adición de enzimas durante el proceso de fermentación. Tesis de grado, Escuela Superior Politécnica del Litoral, Facultad de Ingeniería en Mecánica y Ciencias de la Producción, Guayaquil.
- NTE INEN 175. (1986). Norma Técnica Ecuatoriana, Servicio Ecuatoriano de Normalización. Cacao en grano – Ensayo de corte.
- NTE INEN 176. (2000). Norma Técnica Ecuatoriana, Servicio Ecuatoriano de Normalización. Cacao en grano, Requisitos. Cacao y productos de cacao.
- NTE INEN177. (1995). Norma Técnica Ecuatoriana, Servicio Ecuatoriano de Normalización. Cacao en grano – Muestreo.
- Papalexandratou, Z., Falony, G., Romanens, E., Jimenez, J. C., Amores, F., Daniel, H.-M., y otros. (2011). Species diversity, community dynamics, and metabolite kinetics of the microbiota associated with traditional ecuadorian spontaneous cocoa bean fermentations. Vrije Universiteit Brussel, IMDO, Research Group of Industrial Microbiology and Food Biotechnology. Brussels, Belgium: American Society for Microbiology, Applied and Environmental Microbiology. Article, Vol. 77, No 21. p. 7698–7714.
- Pérez, R. (2009). La calidad del cacao. Programa de capacitación a facilitadores y agricultores en la cadena de cacao. CAMAREN, Consorcio de Capacitación para el Manejo de los Recursos Naturales Renovables, INIAP, Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias-Estación Experimental Central de

la Amazonía, Proyecto: Mejoramiento de las bases tecnológicas para desarrollar la competitividad de la cadena del cacao Nacional en las provincias de Sucumbios y Orellana de la zona norte de la amazonía ecuatoriana, Quito.

PROEcuador. (2011). Instituto de Promoción de Exportaciones e Inversiones. Perfil de Cacao en Grano Crudo en Francia. Ministerio de Relaciones Exteriores, Comercio e Integración, Oficina Comercial de Ecuador en Francia, Dirección de Inteligencia Comercial e Inversiones.

PROEcuador. (2013). Instituto de Promoción de Exportaciones e Inversiones. Análisis del sector cacao y elaborados. Dirección de inteligencia comercial e inversiones.

Recalde, A. (2007). Evaluación del efecto del presecado y tiempo de fermentación, en los contenidos de polifenoles totales, alcaloides y ácidos volátiles en dos genotipos de cacao. Tesis doctoral, Universidad Central del Ecuador, Facultad de Ciencias Químicas.

Rivadeneria, A. (2013). Propuesta para el mejoramiento del manejo poscosecha del cultivo de cacao (*Theobroma cacao*) de la variedad CCN-51 en el Cantón Quinsaloma - Los Rios. Tesis de Grado, Universidad Central del Ecuador, Facultad de Ciencias Agrícolas, Carrera de Ingeniería Agronómica, Quito.

Saltos, A. (2005). Efecto de métodos de fermentación frecuencias de remoción y volúmenes variables de masa fresca de cacao sobre la calidad física y organoléptica del complejo "Nacional x Trinitario". Instituto Tecnológico Agropecuario de Vinces, Tesis Ingeniero Agropecuario. Vinces: p. 23-45.

Sánchez, V. (2007). Caracterización organoléptica del cacao (*Theobroma cacao* L.), para la selección de árboles con perfiles de sabor de interés comercial. Tesis de grado, Universidad Técnica Estatal de Quevedo, Facultad de Ciencias Agrarias, Escuela de Ingeniería Agronómica, Quevedo.

Sancho, J., Bota, E., & De Castro, J. (1999). Introducción al análisis de los alimentos. Universidad de Barcelona. Barcelona-España: Edición de la Universidad de Barcelona. p. 28-215.

- Sandoval, A. (2009). Evaluación de fermentaciones de cacao (*Theobroma cacao* L.) clon catongo y comparación con dos clones. Licenciatura en Ciencias Agrícolas, Universidad EARTH, Ingeniería en Agronomía, Guácimo, Limón, Costa Rica.
- Schwan, R. (1998). Cocoa Fermentations Conducted with a Defined Microbial Cocktail Inoculum. *Arti, Applied and Environmental Microbiology*, American Society for Microbiology, Vol. 64, No. 4, Universidade Federal de Lavras, Lavras, Brasil.
- Schwan, R. (2000). Microbiología de la fermentación del cacao: Estudio para mejorar la calidad. CEPLAC/CEPEC/SETEA, Agrotrópica. Itabuna, Bahía, Brasil: Vol. 2, No 1. p. 22-31.
- Seseña, S. (2005). Caracterización tecnológica de cepas autóctonas y selección de cultivos iniciadores para la fermentación de la berenjena de Almagro. Universidad de Castilla-La Mancha, Departamento de Química Analítica y Tecnología de los Alimentos, Facultad de Ciencias del Medio Ambiente. Toledo: Ediciones de la UCLM.
- SINAGAP. (2015). Sistema de Información Nacional de Agricultura, Ganadería, Acuicultura y Pesca. Obtenido de MAGAP., Ministerio de Agricultura, Ganadería, Acuicultura y Pesca, Subsecretaría de comercialización. Cadenas agroproductivas, Cacao: <http://sinagap.agricultura.gob.ec/index.php/2012-12-13-15-09-13/cadenas-cacao-spr>
- Vargas, J. (1988). Comparación de la fermentación de pequeñas cantidades de cacao en tres diferentes altitudes de Costa Rica. Universidad de Costa Rica, Tesis de ingeniería. Turrialba - Costa Rica: p. 15,20.
- Vega, H., & Beillard, M. (2015). Ecuador cocoa update and outlook. USDA Foreign Agricultural Service, Global Agricultural Information Network. Quito: Agricultural situation, Agriculture in the economy, No EC15002.
- Vera, J. (1993). Antecedentes históricos y zonificación y ecología del cultivo. Manual del cultivo de cacao No 25. 2da edición. p. 6–294., INIAP, Instituto Nacional Autónomo de Investigaciones Agropecuarias, Estación Experimental Tropical Pichilingue, Quevedo.

- Villacís, F., Tobar, J., & Jaramillo, E. (2013). Cacao: El fino aroma de nuestra identidad. Ministerio Coordinador de Patrimonio, Dirección de Proyectos Emblemáticos. Quito: Bucci Design, 2da Edición.
- Villavicencio, A. (2001). Caracterización química del nivel de fermentación y estudio de los parámetros de calidad del cacao (*Theobroma cacao* L.) producido en el Ecuador. Tesis de licenciatura en química especialización química analítica, Pontificia Universidad Católica del Ecuador, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Departamento de Ciencias Químicas, Quito.
- Wacher, M. (2011). Microorganismos y chocolate. Universidad Nacional Autónoma de México, Dirección General de Cómputo y de Tecnologías de Información y Comunicación. Revista Digital Universitaria. Vol. 12, No 4, ISSN: 1067-6079.
- Wakao, H. (2002). Estudio de la variación del contenido de alcaloides en cacao (*Theobroma cacao* L.) de producción Nacional, durante el proceso de beneficio. Tesis de licenciatura en ciencias químicas especialidad química analítica, Pontificia Universidad Católica del Ecuador, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Departamento de Ciencias Químicas, Quito.

IX. ANEXOS