



Aislamiento e identificación de microorganismos probióticos en distintos tipos de cacao (mucílago), CCN-51, Trinitario y Forastero para su aplicación como agente antimicrobiano.

Anchundia Arriaga, Adriana Belén y Torres Vincent, Viviana Gabriela

Departamento de Ciencias de la vida y Agricultura

Carrera de Ingeniería en Biotecnología

Trabajo de titulación, previo a la obtención al título de Ingeniería en Biotecnología

PhD. Sánchez Llaguno, Sungey Naynee

24 de febrero de 2022



**DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA
CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA**

CERTIFICACIÓN

Certifico que el trabajo de integración curricular, “**Aislamiento e identificación de microorganismos probióticos en distintos tipos de cacao (mucílago), CCN-51, Trinitario y Forastero para su aplicación como agente antimicrobiano**” fue realizado por las señoritas **Anchundia Arriaga Adriana Belén y Torres Vincent Viviana Gabriela** el cual ha sido revisado y analizado en su totalidad por la herramienta de verificación de similitud de contenido; por lo tanto cumple con los requisitos legales, teóricos, científicos, técnicos y metodológicos establecidos por la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE, razón por la cual me permito acreditar y autorizar para que lo sustente públicamente.

Santo Domingo de los Tsáchilas, 24 de febrero del 2022

Firma:



.....
Sánchez Llaguno Sungey Naynee, PhD.

C.C.: 1205348673

Directora del Proyecto de Investigación



**DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA
CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA**

RESPONSABILIDAD DE AUTORÍA

Nosotras, **Anchundía Arriaga Adriana Belén** y **Torres Vincent Viviana Gabriela**, con cédulas de ciudadanía n° 1718766221 y 2300048473, declaramos que el contenido, ideas y criterios del trabajo de integración curricular: **“Aislamiento e identificación de microorganismos probióticos en distintos tipos de cacao (mucilago), CCN-51, Trinitario y Forastero para su aplicación como agente antimicrobiano”** es de nuestra autoría y responsabilidad, cumpliendo con los requisitos legales, teóricos, científicos, técnicos, y metodológicos establecidos por la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE, respetando los derechos intelectuales de terceros y referenciando las citas bibliográficas.

Santo Domingo de los Tsáchilas, 24 de febrero del 2022

Firma:

Anchundía Arriaga Adriana Belén

C.C.: 1718766221

Firma:

Torres Vincent Viviana Gabriela

C.C.: 2300048473



**DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA
CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA**

AUTORIZACIÓN DE PUBLICACIÓN

Nosotras **Anchundia Arriaga Adriana Belén** y **Torres Vincent Viviana Gabriela**, con cédulas de ciudadanía n° 1718766221 y 2300048473, autorizamos a la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE publicar el trabajo de integración curricular: **“Aislamiento e identificación de microorganismos probióticos en distintos tipos de cacao (mucílago), CCN-51, Trinitario y Forastero para su aplicación como agente antimicrobiano”** en el Repositorio Institucional, cuyo contenido, ideas y criterios son de nuestra responsabilidad.

Santo Domingo de los Tsáchilas, 24 de febrero del 2022

Firma:

Anchundia Arriaga Adriana Belén

C.C.: 1718766221

Firma:

Torres Vincent Viviana Gabriela

C.C.: 2300048473

DEDICATORIA

Este trabajo se lo dedico a Dios, por siempre forjar mi camino y no abandonarme en los momentos más difíciles de mi vida.

A mis queridos padres, por apoyarme incondicionalmente en todo momento, por aconsejarme y guiarme en todas las etapas de mi vida, ustedes son mi mayor motivación.

A mi pequeña hermana y a mis adorados abuelos, quienes me han brindado todo su amor y atención cuando más lo he necesitado y a toda mi familia en general, por ser un gran aporte en mi vida.

Adriana

Dedico este trabajo a Dios por ser mi guía y darme la fortaleza para continuar sin desfallecer en aquellos momentos de dificultad.

A mi ángel del cielo mi padre Patricio, por ser mi mayor fuente de inspiración al plasmar sus valores y virtudes inculcados en mí, te siento conmigo siempre.

A mi amada madre Viviana por ayudarme a crecer, por ser mi soporte y apoyo incondicional durante toda mi vida.

A mi hermano Bryan por apoyarme y estar conmigo siempre que lo necesito.

Viviana

AGRADECIMIENTO

Agradezco a Dios por ser la guía que necesitaba a lo largo de toda mi carrera y por darme fortaleza y sabiduría para continuar.

A mi familia, por brindarme su comprensión y apoyo incondicional en todo momento y, sobre todo, por orientarme a ser siempre una mejor persona.

A la Universidad de las Fuerzas Armadas "ESPE" sede Santo Domingo y a sus profesionales, por impartir conocimientos, los cuales han sido de gran importancia en mi formación académica.

A mi tutora Ph.D. Sungey Sánchez por su asesoramiento y atención brindada durante el desarrollo de este trabajo y al Ph.D. Juan Neira por su contribución y orientación durante toda esta etapa.

A una de las personas más importantes en mi vida, Juan, por siempre estar conmigo en los buenos y malos momentos, brindándome toda su atención y afecto.

A Viviana, Sonia y Brandon por compartir conmigo muy buenos momentos, con su compañía todo ha sido más agradable.

A la familia Chalar-Mendoza por su aporte en la obtención de la materia prima, fundamental para la realización de este trabajo y a todas las personas que, de alguna manera, me han apoyado durante mi carrera.

Adriana

Agradezco a mis padres y hermano por todo el apoyo y el ánimo que me brindaron durante toda la carrera estudiantil, por motivarme constantemente a alcanzar una de mis metas.

A mi tutora PhD. Sungey Sánchez por la paciencia y orientación en base a su experiencia y sabiduría, al igual que el PhD. Juan Neira por su amable ayuda y valiosas sugerencias, mis especiales agradecimientos por hacer posible el desarrollo de este trabajo de investigación.

A la familia Chalar-Mendoza por brindarme la facilidad de obtener la materia prima para llevar a cabo el estudio de investigación.

A una persona muy especial en mi vida, Edgar por su cariño y poder contar con su ayuda incondicional siempre, gracias por todo.

A mi amigo Jorge por su valiosa amistad, por estar siempre para mí desde el inicio hasta el final de la carrera, de igual manera, Adriana y Sonia por todos los momentos gratificantes compartidos en la universidad, fue un gusto conocerlos.

Viviana

Índice de Contenido

Carátula.....	1
Reporte de verificación de contenido.....	2
Certificación	3
Responsabilidad de autoría	4
Autorización de publicación.....	5
Dedicatoria	6
Agradecimiento.....	8
Índice de contenido.....	10
Índice de tablas	16
Índice de figuras	18
Resumen	19
Abstract.....	20
Capítulo I	21
Introducción.....	21
Objetivos.....	23
Objetivo general	23
Objetivos específicos.....	23
Hipótesis.....	24
Hipótesis para el Factor A (Variedades de mucílago de cacao)	24
Hipótesis para el Factor B (Microorganismos patógenos).....	24
Capítulo II	25
Revisión de literatura	25
El Cacao	25
<i>Generalidades</i>	25

<i>Cosecha</i>	25
<i>Taxonomía del Cacao</i>	26
<i>Genotipo de Cacao</i>	26
<i>Variedades de Cacao</i>	27
<i>Producción</i>	28
<i>Mucílago del cacao</i>	28
<i>Fermentación</i>	29
Microorganismos probióticos.....	29
Generalidades.....	29
Especies microbianas con aplicaciones probióticas.....	30
Propiedades probióticas y mecanismos de actividad.....	30
Bacterias Ácido Lácticas.....	30
Generalidades.....	30
Clasificación	31
<i>Productos sintetizados</i>	31
Ácidos orgánicos	31
Vitaminas.....	32
Exopolisacáridos (EPS).....	32
Ácido gamma-aminobutírico.....	32
Bacteriocinas.....	33
<i>Moniliophthora roreri</i>	33
Generalidades.....	33
Origen y Distribución	34
Taxonomía y Biología.....	34
Ciclo de la enfermedad	34
Estrategias de control.....	35

<i>Aspergillus niger</i>	36
<i>Generalidades</i>	36
<i>Taxonomía</i>	36
<i>Morfología</i>	37
<i>Hábitat</i>	37
<i>Ciclo de vida</i>	37
Capítulo III	38
Metodología	38
Ubicación del área de investigación.....	38
<i>Ubicación política</i>	38
<i>Ubicación ecológica</i>	38
<i>Ubicación geográfica</i>	38
Materiales	40
Determinación de pH.....	40
Determinación de acidez titulable.....	40
Determinación de sólidos solubles	40
Aislamiento de bacterias ácido lácticas	41
Identificación de bacterias ácido lácticas	41
Recuento de poblaciones microbianas (BAL).....	42
Aislamiento de microorganismos patógenos (<i>Moniliophthora roreri</i> y <i>Aspergillus niger</i>)	42
Identificación de microorganismos patógenos (<i>Moniliophthora roreri</i> y <i>Aspergillus niger</i>)	43
Determinación de actividad antimicrobiana de BAL frente a microorganismos patógenos (<i>Moniliophthora roreri</i> y <i>Aspergillus niger</i>)	44
Métodos	45

<i>Obtención de la materia prima</i>	45
<i>Fermentación del mucílago de cacao</i>	45
<i>Aislamiento de bacterias ácido lácticas</i>	45
Identificación de bacterias ácido lácticas	45
<i>Preparación del frotis</i>	45
<i>Tinción de Gram</i>	46
<i>Prueba de catalasa</i>	46
<i>Secuenciación y análisis filogenético</i>	46
Siembra de cajas madre	46
<i>Aislamiento de Moniliophthora roreri</i>	46
<i>Aislamiento de Aspergillus niger</i>	46
<i>Identificación de Moniliophthora roreri y Aspergillus niger</i>	47
Actividad antimicrobiana	47
<i>Solución libre de células (SLC)</i>	47
Diseño Experimental.....	48
Factores del experimento	48
Tratamientos a comparar	48
<i>Tipo de diseño experimental</i>	49
<i>Repeticiones</i>	49
Análisis estadístico	49
<i>Análisis funcional</i>	50
Variables a medir	50
<i>Determinación de pH</i>	50
<i>Determinación de sólidos solubles</i>	50
<i>Determinación de acidez titulable</i>	50
<i>Recuento de poblaciones microbianas (BAL)</i>	51

<i>Diámetro del halo de inhibición de SLC</i>	52
Capítulo IV.....	53
Resultados	53
Análisis físico-químicos del mucílago de cacao	53
Análisis de varianza para la variable pH	53
Análisis de varianza para la variable sólidos solubles	53
Análisis de varianza para la variable acidez titulable	54
Resultados del estudio de las variedades del mucílago del cacao (Factor A)	54
Resultados del estudio sobre el estado del mucílago de cacao (Factor B)	56
Prueba de Tukey para la determinación de las interacciones significativas en los parámetros físico-químicos.....	58
Análisis de Tukey para la interacción A*B (Variedad*Estado del mucílago)	58
Parámetros microbiológicos del mucílago de cacao	61
Caracterización morfológica macroscópica	62
Identificación de bacterias ácido lácticas (BAL) producidas por la fermentación del mucílago de cacao	63
Secuenciación	65
Caracterización morfológica de microorganismos patógenos	65
Inhibición de SLC frente a microorganismos patógenos	67
Análisis de varianza del diámetro de inhibición.....	70
Prueba de significancia de Tukey para los factores de estudio en la actividad antimicrobiana	70
Resultados del estudio de las variedades del mucílago del cacao (Factor A) para su inhibición.....	70
Resultados del estudio de los patógenos (Factor B) para su inhibición.....	71
Prueba de Tukey para la determinación de la interacción significativa en la actividad antimicrobiana	72

Análisis de Tukey para la interacción A*B (Variedad*Patógeno)	72
Análisis de conglomerados.....	75
Análisis de componentes principales para parámetros físico-químicos	77
Capítulo V.....	80
Discusión	80
Recuento microbiano.....	80
Parámetros físico-químicos	80
Variedades de mucílago de cacao (Factor A)	80
Estado del mucílago (Factor B)	81
Respecto a la interacción A*B (Variedades * Estado del mucílago)	82
Actividad antimicrobiana	84
Variedades de mucílago de cacao (Factor A)	84
Microorganismos patógenos (Factor B).....	84
Respecto a la interacción A*B (Variedades * Microorganismo Patógeno)	85
Capítulo VI.....	86
Conclusiones	86
Factor A (<i>Variedades</i>)	86
Factor B (Microorganismos patógenos)	86
Factor A*B (Variedades*Microorganismos patógenos).....	86
Recomendaciones	87
Capítulo VII.....	88
Bibliografía	88

Índice de Tablas

Tabla 1. Taxonomía y clasificación del cacao	26
Tabla 2. Taxonomía de <i>Aspergillus niger</i>	36
Tabla 3. Recursos empleados para la determinación del pH.....	40
Tabla 4. Recursos empleados para la determinación de acidez titulable.....	40
Tabla 5. Recursos empleados para la determinación de sólidos solubles	40
Tabla 6. Recursos empleados para el aislamiento de bacterias ácido lácticas presentes en la fermentación.....	41
Tabla 7. Recursos empleados para la identificación de bacterias ácido lácticas	41
Tabla 8. Recursos empleados para el recuento de poblaciones microbianas (BAL)	42
Tabla 9. Recursos empleados para el aislamiento de <i>Moniliophthora roreri</i> y <i>Aspergillus niger</i>	42
Tabla 10. Recursos empleados para la identificación de <i>Moniliophthora roreri</i> y <i>Aspergillus niger</i>	43
Tabla 11. Recursos empleados para la inhibición de BAL frente a <i>Moniliophthora roreri</i> y <i>Aspergillus niger</i>	44
Tabla 12. Factores y Niveles a probar en la actividad antimicrobiana de las BAL frente a microorganismos patógenos.....	48
Tabla 13. Tratamientos a comparar en el efecto antimicrobiano de las BAL frente a microorganismos patógenos.....	48
Tabla 14. Esquema de análisis de varianza para el estudio de la actividad antimicrobiana de las BAL frente a microorganismos patógenos.....	49
Tabla 15. Análisis de varianza de la variable pH del mucilago de cacao fermentado	53
Tabla 16. Análisis de varianza de la variable sólidos solubles del mucilago de cacao fermentado	53
Tabla 17. Análisis de varianza de la variable acidez del mucilago de cacao fermentado.....	54
Tabla 18. Resultados del análisis de la prueba Tukey para el factor A en las variables físico-químicas	54

Tabla 19. Resultados del análisis de la prueba Tukey para el factor B en las variables físico-químicos	56
Tabla 20. Resultados del análisis de la prueba Tukey para la interacción A*B para la variable pH.....	58
Tabla 21. Resultados del análisis de la prueba Tukey para la interacción A*B para la variable sólidos solubles.....	58
Tabla 22. Resultados del análisis de la prueba Tukey para la interacción A*B para la variable acidez titulable	59
Tabla 23. Recuento de poblaciones microbianas	61
Tabla 24. Características morfológicas de las tres variedades de mucílago de cacao ...	62
Tabla 25. Caracterización morfológica microscópica de (BAL).....	63
Tabla 26. Prueba de catalasa	65
Tabla 27. Resultados de la secuenciación	65
Tabla 28. Características morfológicas macroscópicas de las cepas fúngicas de <i>Moniliophthora roreri</i> y <i>Aspergillus niger</i>	66
Tabla 29. Identificación microscópica de los microorganismos patógenos	67
Tabla 30. Antibiograma por el método de Kirby Bauer de la SLC de las diferentes variedades de mucílago de cacao frente a microorganismos patógenos.....	68
Tabla 31. Análisis de varianza de la inhibición de las BAL frente a los microorganismos patógenos	70
Tabla 32. Resultados del análisis de la prueba Tukey para el factor A en la variable inhibición	70
Tabla 33. Resultados del análisis de la prueba Tukey para el factor B en la variable inhibición	71
Tabla 34. Resultados del análisis de la prueba Tukey para la interacción A*B en la variable inhibición.....	72
Tabla 35. Matriz de correlaciones de componentes principales	77
Tabla 36. Matriz de componentes	77
Tabla 37. Porcentaje de varianza total explicada	78

Índice de Figuras

Figura 1. <i>Ciclo de la enfermedad de <i>Moniliophthora roreri</i> en <i>Theobroma cacao</i>.</i>	35
Figura 2. <i>Mapa de ubicación geográfica del área de investigación</i>	39
Figura 3. <i>Estudio del efecto de las variedades del mucílago de cacao (Factor A) en las variables de estudio</i>	55
Figura 4. <i>Estudio del efecto del estado del mucílago (Factor B) en las variables de estudio</i>	57
Figura 5. <i>Estudio del efecto de la interacción A*B para los parámetros físico-químicos</i> .60	
Figura 6. <i>Gráfico de control del recuento microbiológico de las diferentes variedades de mucílago fresco de cacao</i>	61
Figura 7. <i>Estudio del efecto del (Factor A) en la variable inhibición</i>	71
Figura 8. <i>Estudio del efecto del Factor B en la variable inhibición</i>	72
Figura 9. <i>Estudio del efecto de la interacción A*B en la variable inhibición</i>	73
Figura 10. <i>Dendograma para los parámetros físico-químicos</i>	75
Figura 11. <i>Dendograma para la actividad antimicrobiana de las BAL frente a los patógenos</i>	76
Figura 12. <i>Gráfica de sedimentación</i>	78
Figura 13. <i>Gráfica de componentes principales</i>	79

Resumen

En la presente investigación se tuvo como objetivo evaluar la actividad antimicrobiana de bacterias ácido lácticas, obtenidas a partir de la fermentación del mucílago de cacao frente a microorganismos patógenos como *Moniliophthora roreri* y *Aspergillus niger*, teniendo en cuenta que estos patógenos son los causantes de enfermedades que afectan la producción y calidad del cacao, por lo cual, se busca una alternativa que contribuya como un control biológico antifúngico. El estudio se realizó en el laboratorio de Bromatología-Microbiología de la Universidad de las Fuerzas Armadas "ESPE" extensión Santo Domingo. Se evaluaron parámetros físico-químicos como el pH, sólidos solubles y acidez titulable del mucílago fresco y fermentado de cacao, así mismo, se realizó el recuento microbiano de la muestra y se aislaron bacterias ácido lácticas en medio MRS agar por la técnica de estrías, posteriormente fueron inoculadas en caldo MRS para la obtención de solución libre de células (SLC), la cual se aplicó para evaluar su efecto inhibitorio frente al aislamiento de *Moniliophthora roreri* y *Aspergillus niger* por el método de Kirby Bauer. Se aplicó un diseño bifactorial (Variedades: CCN-51, Trinitario y Forastero; Microorganismos patógenos: *Moniliophthora roreri* y *Aspergillus niger*) con 6 tratamientos y 3 repeticiones. Se identificó que las bacterias predominantes en la fermentación fueron *Lactobacillus plantarum* y *Lactobacillus fermentum* y se determinó que los mejores tratamientos con actividad antimicrobiana fueron las SLC, obtenidas a partir de *Lactobacillus plantarum* frente a *Aspergillus niger*.

Palabras clave:

- **BACTERIAS ÁCIDO LÁCTICAS**
- **SOLUCIÓN LIBRE DE CÉLULAS**
- **ASPERGILLUS NIGER**
- **MONILIOPHTHORA RORERI**
- **ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA**

Abstract

In the present investigation, the objective was to evaluate the antimicrobial activity of lactic acid bacteria obtained from the fermentation of cocoa mucilage against pathogenic microorganisms such as *Moniliophthora roreri* and *Aspergillus niger*, taking into account that these pathogens are the cause of diseases that affect the production. and cocoa quality, for which an alternative is sought that contributes as antifungal biological control. The study was carried out in the Bromatology-Microbiology laboratory of the University of the Armed Forces "ESPE" Santo Domingo extension. Physico-chemical parameters such as pH, soluble solids and titratable acidity of fresh and fermented cocoa mucilage were evaluated, likewise the microbial count of the sample was carried out and lactic acid bacteria were isolated in MRS agar medium by the streak technique, subsequently were inoculated in MRS broth to obtain a cell-free solution (SLC), which was applied to evaluate its inhibitory effect against the isolation of *Moniliophthora roreri* and *Aspergillus niger* by the Kirby Bauer method. A bifactorial design was applied (Varieties: CCN-51, Trinitario and Forastero; Pathogenic microorganisms: *Moniliophthora roreri* and *Aspergillus niger*) with 6 treatments and 3 repetitions. It was identified that the predominant bacteria in the fermentation were *Lactobacillus plantarum* and *Lactobacillus fermentum* and it was determined that the best treatments with an inhibitory effect were the SLC obtained from *Lactobacillus plantarum* against *Aspergillus niger*.

Key words:

- **LACTIC ACID BACTERIA**
- **CELL-FREE SOLUTION**
- ***ASPERGILLUS NIGER***
- ***MONILIOPTHORA RORERI***
- **ANTIMICROBIAL ACTIVITY**

Capítulo I

Introducción

El cacao (*Theobroma cacao L.*) constituye uno de los productos de exportación más importantes y tradicionales de Ecuador, por lo que, este cultivo ha estado fuertemente vinculado a la economía del país desde hace más de un siglo, siendo los granos de cacao un referente importante de exportación (Marina Ureta Santana & María Santos Roldán Beatriz Palacios Florencio, 2021).

Ecuador produce y exporta dos tipos principales de cacao: alrededor del 70% de las exportaciones son de la variedad Nacional, mientras que, el 30% de las exportaciones son derivadas del Clon CCN-51 (Jimenez et al., 2017).

Sin embargo, la sostenibilidad del producto, suele verse afectada por diversas especies de plagas y enfermedades fúngicas como la escoba de bruja causada por *Moniliophthora perniciosa* y la moniliasis causada por *Moniliophthora roreri*, que son las enfermedades más recurrentes en el país (Copetti et al., 2011). Además, cabe recalcar que la presencia de hongos en los alimentos son también un problema de salud debido a la producción de metabolitos secundarios, por lo que, *Aspergillus* es uno de los principales géneros capaces de producir micotoxinas, las cuales tienen efectos mutagénicos, teratogénicos y cancerígenos tanto en humanos como en animales, como es el caso de *Aspergillus niger* que es uno de los responsables del deterioro del cacao, en particular de las almendras, debido a la producción de ocratoxina A que puede conducir a enfermedades infecciosas como las aspergilosis pulmonar invasiva (Romero-Cortes et al., 2019).

Estas enfermedades causadas por hongos son una limitación principal en la producción de cacao, ya que pueden alterar mazorcas, flores, tallos y hojas, reduciendo la producción del cacao y la calidad del grano con plantaciones afectadas, produciendo pérdidas en rendimiento y en muchos casos, la pérdida total de la producción. Por lo tanto, el mejoramiento en cuanto a la resistencia a enfermedades en el cacao es un factor importante para mantener la sostenibilidad del mismo, ya que existe una preocupación sobre la resistencia a fungicidas, la seguridad y eficacia de plaguicidas (Li et al., 2020).

Una alternativa para inhibir la presencia de estos hongos son las bacterias ácido lácticas (BAL) con capacidad probiótica, las cuales juegan un papel clave en las fermentaciones de alimentos, donde no solo contribuyen al desarrollo de las propiedades sensoriales deseadas en el producto final sino también a su seguridad microbiológica. El efecto antimicrobiano de las BAL se relaciona principalmente con la producción de ácido láctico y acético, así como propiónico, ácido sórbico, benzoico, peróxido de hidrógeno, diacetilo, etanol, compuestos fenólicos y proteínáceos, sin embargo, algunas cepas son capaces de sintetizar sustancias antimicrobianas y bacteriocinas (Cizeikiene et al., 2013).

Objetivos

Objetivo general

Aislar e identificar microorganismos probióticos en distintos tipos de mucílago de cacao, CCN-51, Trinitario y Forastero para su aplicación como agente antimicrobiano.

Objetivos específicos

Aislar microorganismos probióticos presentes en la fermentación en distintos tipos de cacao (mucílago), CCN-51, Trinitario y Forastero.

Identificar los microorganismos probióticos presentes en la fermentación en distintos tipos de cacao (Mucílago), CCN-51, Trinitario y Forastero.

Evaluar la actividad antimicrobiana de los microorganismos probióticos obtenidos en la fermentación del mucílago de cacao frente a microorganismos patógenos (*Moniliophthora roreri* y *Aspergillus niger*).

Hipótesis

Hipótesis para el Factor A (Variedades de mucílago de cacao)

Ho: Las bacterias ácido lácticas con capacidad probiótica presentes en la fermentación influyen en la actividad antimicrobiana.

Ha: Las bacterias ácido lácticas con capacidad probiótica presentes en la fermentación no influyen en la actividad antimicrobiana.

Hipótesis para el Factor B (Microorganismos patógenos)

Ho: El tipo de patógeno influye en la actividad antimicrobiana de bacterias ácido lácticas con capacidad probiótica.

Ha: El tipo de patógeno no influye en la actividad antimicrobiana de bacterias ácido lácticas con capacidad probiótica.

Capítulo II

Revisión de Literatura

El Cacao

Generalidades

El árbol del cacao (*Theobroma cacao*) es originario de América Central y del Sur tropical, crece naturalmente en el piso inferior de la selva tropical siempre verde en la cuenca del Amazonas. El cacao presenta alrededor del 80% de su constitución en la corteza y el 20% restante incluye semillas, pulpa y otros componentes (Hermann A. Jürgen Pohlen, 2010).

Tradicionalmente, el cacao se cultiva bajo la sombra de un bosque raleo. Los árboles de cacao forman una espesa capa de dosel intermedia entre la vegetación del suelo (que se vuelve en gran parte sombreada) y la capa superior de dosel de los árboles del bosque. El árbol del cacao adquiere gran parte de su fauna de plagas del bosque circundante y la acumulación de plagas de la fauna nativa ocurre rápidamente después de que el cacao se establece en una región (Valderrama, 2020).

Theobroma cacao produce pequeñas flores en pequeños grupos en los troncos y ramas principales inferiores de los árboles. Las flores polinizadas se convierten en bayas ('vainas') y maduran durante un período de 5 a 6 meses. La baya es una drupa de 2,5 a 4,0 cm por 1,25 a 1,75 cm de tamaño, que contiene de 20 a 40 semillas (frijoles) y está rodeada por una pulpa mucilaginosa (Valderrama, 2020).

Cosecha

Theobroma cacao normalmente comienza a dar frutos después de 3 años y el rendimiento alcanza un máximo después de 8 a 9 años. Los árboles dan simultáneamente flores, frutos en desarrollo y frutos maduros. Las vainas se desarrollan en el tronco y las ramas. Después de unos 5-6 meses de desarrollo, las vainas maduran y se vuelven amarillas o anaranjadas. La recolección se realiza con distintas frecuencias (1 a 4 semanas). Las mazorcas se abren el mismo día o después de unos días para permitir que se acumule una cantidad suficiente para la etapa de fermentación. Los frijoles se retiran y se separan de la placenta. En esta etapa se recubren de una pulpa dulce y mucilaginosa (Dini, 2019).

Taxonomía del Cacao

Este cultivo pertenece a la familia Malvaceae y se conocen más de 20 especies dentro del género *Theobroma*. Entre ellos, *T. cacao* es la única especie que se cultiva extensivamente (Wickramasuriya & Dunwell, 2018).

Tabla 1.

Taxonomía y clasificación del cacao

Dominio	Eukaryota
Reino	Plantae
Subreino	Tracheobionta
Superdivisión	Spermatophyta
División	Magnoliophyta
Filo	Espermatophyta
Subfilo	Angiospermas
Clase	Magnoliopsida
Subclase	Dilleniidae
Orden	Malvales
Familia	Malvaceae
Género	<i>Theobroma</i>
Especie	<i>Theobroma cacao</i>

Autores: (Bhattacharjee & Akoroda, 2018)

Genotipo de Cacao

En la actualidad, la clasificación del cacao más extendida se basa en el sabor, generando una categorización comercial que incluye cuatro genotipos principales de *Theobroma cacao*. (1) Forastero, considerado por su calidad a granel. (2) Criollo, catalogado como cacao fino y aromatizado. (3) Trinitario, que es un híbrido entre Forastero y Criollo, el cual, se puede considerar como cacao a granel o fino; y (4) Nacional que es un genotipo nativo de Ecuador definido como cacao fino.

Por otro lado, el clon CCN-51 (Colección Castro Naranjal 51) es actualmente uno de los recursos genéticos más importantes y cultivares más extendidos en Ecuador, siendo apreciado por su alta productividad y resistencia a enfermedades (Boza et al., 2014).

El genotipo del cacao determina el tipo y la cantidad de proteínas de almacenamiento, carbohidratos, polifenoles y la actividad de las enzimas dentro de las semillas. La composición química de cada genotipo de cacao condiciona la producción de precursores del sabor, que se generan durante la fermentación espontánea. Estos precursores son de gran interés por su papel directo en la calidad organoléptica final del chocolate (Santander Muñoz et al., 2019).

Variedades de Cacao

Existen tres grupos distintos dentro de la especie cacao, las dos tradicionales razas son Criollo y Forastero, además del tercer grupo derivado llamado Trinitario. Estas variedades han surgido como resultado de las diferencias en cuanto a su morfología, características genéticas y sus orígenes geográficos.

Criollo: Fue desarrollado en el norte de Sudamérica y América central siendo los Mayas los responsables de su domesticación. El cacao criollo es normalmente suave, arrugado y produce alrededor de 20-30 semillas por vaina, por lo cual, esta característica se clasifica comparativamente como un cacao de bajo rendimiento en relación con las otras dos variedades de cacao disponibles. Por otro lado, también son muy susceptibles a las plagas y enfermedades como resultado de su menor nivel de adaptabilidad (Díaz-Valderrama et al., 2020).

Forastero: Se originaron en la cuenca baja del Amazonas, el cual, se destaca por su vigor de crecimiento superior, mayor rendimiento de granos y, lo que es más importante, su capacidad para tolerar enfermedades. El cacao forastero tiene una importancia muy significativa, representan alrededor del 90% de la producción mundial total de cacao. Generalmente es dura, robusta y suave en términos de textura de la vaina, además de ser reproductivos superiores que la variedad de cacao Criollo, produciendo un promedio de más de 30 semillas en cada vaina (Díaz-Valderrama et al., 2020).

Trinitario: Es producto de la hibridación entre el Criollo y genotipos de Forastero de la Amazonia inferior. Los árboles de cacao trinitario están compuestos por una colección heterogénea de árboles con origen en Trinidad, por lo tanto, poseen todas las características intermedias de las variedades de cacao Criollo y Forastero. Los árboles de cacao trinitario son muy productivos y tienden a producir mazorcas de cacao durante

todo el año, con períodos pico que varían entre la producción de los países. También, muestran una reacción variable a las plagas y enfermedades; además, parecen ser resistentes asemejándose a las características del Forastero (Díaz-Valderrama et al., 2020).

El CCN-51 (Colección Castro Naranjal) es un cacao clonado de origen ecuatoriano, siendo actualmente uno de los recursos genéticos más importantes y de mayor difusión en el país. Se destaca por tener un cultivar precoz, altamente productivo y resistente a enfermedades que produce vainas y frijoles grandes después de solo 2 años de trasplante al campo (Boza et al., 2014b).

Producción

Theobroma cacao L. es un importante cultivo comercial en las regiones tropicales de cultivo del mundo y, en particular, para los pequeños productores de cacao, por lo que la producción de cacao juega un papel importante tanto para el desarrollo social y económico (Coulibaly & Erbao, 2019). Durante las últimas dos décadas, la variedad de CCN-51 se ha convertido en uno de los cultivares más plantados en Ecuador, principalmente como resultado de su alta productividad y resistencia a enfermedades (Yaw Berbiye, 2014).

Ecuador es el quinto mayor productor de cacao en el mundo, controla más del 65% del mercado del cacao utilizado en chocolates de la más alta calidad (Blare & Useche, 2014).

En el Ecuador, se cultivan muchas variedades de cacao, no obstante, la variedad conocida como 'Nacional', es la más apetecida por los productores de chocolate, debido a la calidad de sus granos y en la finura de su sabor. Sin embargo, el severo ataque de plagas y enfermedades ha causado pérdidas, por lo cual, se han introducido otras variedades. Con el tiempo, estas variedades se han cruzado con el cacao nacional, dando origen a híbridos vigorosos y productivos, pero cuyos frutos tienen menor calidad aromática que el nacional (Micheli et al., 2010).

Mucílago del cacao

La pulpa de cacao es una capa fibrosa blanca y húmeda que cubre los granos de cacao frescos. Con un pH bajo, que suele oscilar entre 3,3 y 3,9. La pulpa de cacao

fresca contiene 83–86 % de agua, 11–13 % de azúcares (D-glucosa, D-fructosa y sacarosa), 0,5–1,2 % de pectina, 0,2–3 % hemicelulosas, 0,7–0,9 % de celulosa, 0,1–0,3 % de lignina y 0,3–1,3 % de ácido cítrico (Haase et al., 2021). Además, contiene proteínas, aminoácidos, vitaminas (principalmente vitamina C) y también están presentes minerales. Por otro lado, la pulpa mucilaginosa es un excelente sustrato para el crecimiento microbiano (Guzmán-Alvarez & Márquez-Ramos, 2021).

Es un sustrato que caracteriza la sucesión microbiana durante la fermentación nativa y contribuye a los atributos de sabor de los granos de cacao fermentados. Los estudios de fermentación del cacao han demostrado que existe una influencia del genotipo en las características de sabor del frijol, y parte de la calidad del producto final depende de las características de la materia prima utilizada (Cerri et al., 2019).

Fermentación

La fermentación del grano de cacao es un proceso espontáneo impulsado por una sucesión microbiana ordenada de una amplia gama de levaduras, bacterias del ácido láctico y del ácido acético, algunas bacterias aeróbicas formadoras de esporas y varias especies de hongos filamentosos (Guzmán-Alvarez & Márquez-Ramos, 2021).

El proceso de fermentación del mucílago de cacao se caracteriza por una sucesión microbiana; primero participan las levaduras, luego actúan las bacterias ácido lácticas (BAL) y finalmente, intervienen las bacterias acéticas (BAA). También intervienen bacilos formadores de esporas del género *Bacillus* y hongos filamentosos (Guzmán-Alvarez & Márquez-Ramos, 2021).

Microorganismos probióticos

Generalidades

La Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO) y la Organización Mundial de la Salud (OMS) definen los microorganismos probióticos como microorganismos vivos que aportan beneficios para la salud humana, al ser administrados en cantidades adecuadas y se pueden encontrar en el yogur y otros alimentos fermentados, suplementos dietéticos y productos de belleza. Dentro de sus principales funciones, ayudan al cuerpo a mantener una comunidad saludable de microorganismos, producen sustancias con efectos deseables e influyen en la respuesta inmunológica del organismo. Cabe recalcar que, los probióticos no son iguales a los

prebióticos, los cuales, son carbohidratos complejos como la insulina y otros fructooligosacáridos, que son utilizados como combustible de metabolismo por los microorganismos del tracto gastrointestinal (Fijan, 2014).

Especies microbianas con aplicaciones probióticas

Una de las más importantes especies microbianas con aplicaciones probióticas, son las bacterias ácido lácticas, ya que tienen las propiedades más importantes, siendo las más representativas las que pertenecen a los géneros *Lactococcus* y *Bifidobacterium*. Las bacterias del ácido láctico tienen la capacidad de producir ácido láctico como principal producto final de la fermentación de carbohidratos, mientras que, el género *Bifidobacterium* utiliza una ruta metabólica separada. Otras dos especies que juegan un papel importante en la industria alimentaria, particularmente en productos lácteos, son *Streptococcus thermophilus*. y *Lactococcus lactis*, dos de las bacterias del ácido láctico de mayor importancia comercial (Kechagia et al., 2013).

Propiedades probióticas y mecanismos de actividad

Para que una cepa probiótica potencial pueda ejercer sus efectos beneficiosos, se espera que presente ciertas propiedades deseables como una tolerancia a los ácidos y la bilis, que parece ser crucial para la administración oral, adhesión a las superficies mucosas y epiteliales, la exclusión competitiva de patógenos, prevención de la adhesión y colonización de patógenos, actividad hidrolasa de sales biliares y actividad antimicrobiana contra microorganismos patógenos (Kechagia et al., 2013).

Por otro lado, los probióticos tienen varios mecanismos de acción, que van desde la producción de bacteriocinas y ácidos grasos de cadena corta, a la reducción del pH intestinal y la competencia de nutrientes hasta la estimulación de la función de barrera de la mucosa y la inmunomodulación (Kechagia et al., 2013).

Bacterias Ácido Lácticas

Generalidades

Las bacterias ácido lácticas (BAL) son organismos Gram-positivos (cocos o bacilos), que se caracterizan por ser no formadores de esporas; son catalasa negativos y presentan una alta tolerancia a bajos niveles de pH (Mokoena, 2017). Además, tienen la capacidad de convertir sustratos de hidratos de carbono en ácidos orgánicos,

principalmente ácido láctico y pueden producir una alta gama de metabolitos, conformando un grupo bacteriano que se encuentra extendido en la naturaleza en nichos de origen lácteo (fermentado), cárnico y vegetal, en el tracto gastrointestinal y urogenital de humanos y animales, el suelo y el agua. Las BAL no solo tienen la capacidad para producir ácido láctico a partir de la glucosa, sino también pueden sintetizar sustancias con poder de inhibición como las bacteriocinas, diacilos, peróxido de hidrógeno, entre otras, por lo que, las BAL se han utilizado ampliamente como cultivos iniciadores, probióticos y en la producción de nutracéuticos, debido a su metabolismo versátil (Ruiz Rodríguez et al., 2019).

Clasificación

Actualmente, las BAL se clasifican en el filo Firmicutes, clase Bacilly y orden Lactobacillales y se diferencian según su morfología a nivel celular, tipo de fermentación de glucosa, temperatura óptima de crecimiento y la forma de utilización del azúcar (Mokoena, 2017). Las BAL comprenden 6 familias y aproximadamente 40 géneros, de los cuales, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Aerococcus*, *Alloiococcus*, *Enterococcus*, *Oenococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus*, *Leuconostoc*, *Carnobacterium*, *Dolosigranulum* y *Weissella*, son consideradas las principales BAL; sin embargo, *Lactobacillus* es el género más grande, ya que cuenta con más de 100 especies presentes en sustancias con alto contenido de carbohidratos (Bjö & Koort, 2016).

Según el tipo de fermentación de glucosa, las BAL se clasifican en homofermentativas, las cuales producen únicamente ácido láctico incluyendo los géneros *Lactococcus*, *Pediococcus*, *Enterococcus* y *Streptococcus* y en heterofermentativas, que producen ácido láctico y otras sustancias, que incluyen los géneros *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Enterococcus*, *Streptococcus*, *Pediococcus* y *Leuconostoc*. En cuanto a temperatura óptima de crecimiento, las BAL se clasifican en mesófilos y termófilos (Bjö & Koort, 2016).

Productos sintetizados

Ácidos orgánicos: Las BAL pueden sintetizar gran variedad de ácidos orgánicos, incluyendo el ácido láctico, el cual es un compuesto que se divide en ácido D-láctico y ácido L-láctico y es frecuentemente empleado en los alimentos, medicina, agricultura, entre otras áreas. En cuanto a la fermentación del ácido láctico, las BAL

utilizan glucosa como la principal fuente de carbono para la producción de piruvato a través del proceso de glucólisis y posteriormente producen ácido láctico por la acción de la enzima lactato deshidrogenasa. También producen propionato, acetato, formiato, succinato y 3-hidroxi propionato y pueden metabolizarse en el intestino para producir estos ácidos orgánicos, siendo una característica importante de metabolismo de los probióticos (Wang et al., 2021).

Vitaminas: Se ha demostrado que las BAL también tienen la capacidad de producir una amplia variedad de vitaminas como la riboflavina, ácido fólico, vitamina C, piridoxal, entre otras, siendo compuestos de gran importancia en la industria alimentaria, ya que contribuyen en la fortificación nutricional, la cual, ha permitido la aplicación de las BAL para la elaboración de alimentos fermentados con altas fuentes de vitaminas. El ácido fólico es una vitamina B que está compuesta por purina y ácidos p-aminobenzoico y poliglutámico, siendo *Lactobacillus*, *Lactococcus* y *Streptococcus* las cepas reportadas que pueden sintetizar ácido fólico, mientras que, la riboflavina se produce por hongos y bacterias (Khalili et al., 2020)

Exopolisacáridos (EPS): Durante los últimos años, los exopolisacáridos han sido de gran interés por sus propiedades físicas y sus funciones probióticas, siendo *Streptococcus thermophilus*, *Lactiplantibacillus plantarum*, *Limosilactobacillus reuteri*, *Lactocaseibacillus casei*, las principales BAL que pueden sintetizar los diferentes tipos de EPS relacionados con la adhesión de las BAL y otorgan nuevas características a la fermentación de los alimentos (Biswas Majee et al., 2017). Por otro lado, los EPS se pueden aplicar en la industria alimentaria como aditivos, sobre todo en la industria de lácteos. Un ejemplo es el glucano, el cual se aplica como agente gelificante, espesante, estabilizador y emulsionante, tanto en la producción de alimentos como de cosméticos y también la producción de sus cepas se aplican en alimentos fermentados (Han et al., 2016).

Ácido gamma-aminobutírico: El ácido gamma-aminobutírico o ácido γ -aminobutírico (GABA) es un aminoácido natural de origen no proteico que se encuentra en la naturaleza. En la industria alimentaria existen algunos microorganismos que pueden producir GABA y se utilizan en la producción de ingredientes alimenticios saludables por lo que, las BAL pueden incrementar el contenido de GABA en ciertos alimentos fermentados como cereales. Además, la producción de queso, yogur y leche

por fermentación de las BAL también pueden ser productos con altas fuentes de GABA (Yunes et al., 2016).

Bacteriocinas: Las bacteriocinas son un tipo de metabolito primario correspondientes a polipéptidos, proteínas o complejos proteicos que utilizan ribosomas con efecto antibacteriano, teniendo la capacidad de inhibir, tanto el crecimiento como la reproducción de muchas bacterias (Diep & Nes, 2002). En cuanto a su mecanismo de acción, estas interactúan con la superficie celular, aumentando la permeabilidad de la célula e inhibiendo la producción de la pared celular, la síntesis de ácido nucleico y la síntesis de proteínas (Kumariya et al., 2019).

Las bacteriocinas se clasifican en tres tipos: I, II y III. La categoría I corresponde a los lantibióticos, ya que contienen lantionina (nisina, estreptina, y epidermina). La categoría II son bacteriocinas que no contienen lantionina y en la categoría III, se encuentra la helveticina J, que es producida por *Lactobacillus helveticus* y helveticina M, producida por *Lactobacillus crispatus* (Wang et al., 2021).

Moniliophthora roreri

Generalidades

Moniliophthora roreri es un hongo mitospórico que tiene una única espermatogénesis basipetal y posee septos doliporos ubicados en el micelio. Por otro lado, las conidias sirven como meiosporas, las cuales representan la modificación de un basidium que ha perdido la forma, carnosidad del basidiocarpio y espesor, formando al mismo tiempo un pileus vestigial. Además, las esporas son multifuncionales, teniendo influencia tanto en el intercambio genético como en la dispersión, infección y sobrevivencia (Evans et al., 2003).

En cuanto a la geometría de las esporas, pueden ser esféricas u ovaladas y presentan dos tipos de germinación, las cuales están determinadas por el poro germinativo o por la pared celular, mientras que, el tubo germinativo se ubica en el extremo distal y es posible encontrar estructuras parecidas a un apresorio. Las esporas con una edad más madura se caracterizan por sus paredes con mayor grosor y tonos oscuros, las cuales inician la fase de dormancia (Álvarez et al., 2014).

Origen y Distribución

Moniliophthora roreri es un hongo causante de la moniliasis, que limita la producción y cultivo del cacao y es frecuente en países de América Latina como Ecuador, Colombia, Perú, Honduras, Costa Rica y México (Sterling et al., 2015). Se ha considerado que el hongo es endémico de Ecuador, sin embargo, la evidencia demuestra que el patógeno se introdujo al país desde Colombia (Bailey et al., 2018).

Taxonomía y Biología

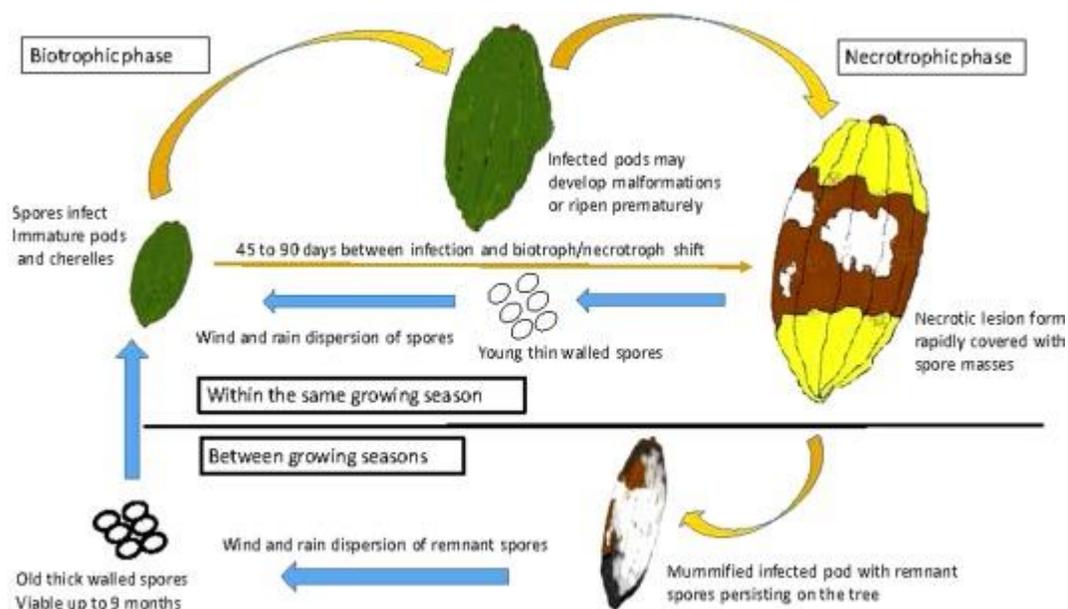
Moniliophthora roreri pertenece al filo *Basidiomycota*, clase *Agaricomycetes*, orden *Agaricales* y familia *Marasmiaceae*. Es un hongo con un estilo de vida hemibiótrofo, el cual, presenta una fase biotrófica de aproximadamente 45 a 90 días, y cuyas esporas son de origen asexual, produciéndose sobre la superficie de la vaina una vez que se haya iniciado la fase necrotrófica. Por otro lado, estas esporas se esparcen a través del viento, de la lluvia y de la actividad humana, presentando síntomas como manchas necróticas o malformaciones en la vaina durante la fase biotrófica; sin embargo, esta no presenta sintomatología (Bailey et al., 2018).

Ciclo de la enfermedad

Las esporas con consistencia pulverulenta se desprenden del pseudoestroma de la vaina y se esparcen por el aire o el movimiento del cultivo para propagarse, cuya densidad celular de esporulación es de 44 millones de esporas/cm². Por lo general, el hongo está presente durante todo el año en Ecuador en la estación húmeda y un pico al inicio del período de lluvias fuertes; sus esporas pueden sobrevivir aproximadamente 9 meses en las vainas, sin embargo, duran alrededor de 1 mes en las vainas que quedan en la tierra. Además, las esporas que son germinadas, se introducen en las vainas a través de los estomas y colonizan los tejidos a nivel intercelular, afectando con mayor frecuencia a mazorcas jóvenes. Luego de la fase biotrófica que dura de 45 a 90 días, el hongo cambia a fase necrotrófica, la cual se caracteriza por la presencia de un micelio estrecho intracelular y de paredes finas, la cual provoca la muerte del tejido en pocos días. Como resultado de esta enfermedad, se producen lesiones en forma de manchas de color marrón que se unen para cubrir totalmente la superficie de la vaina, y finalmente, por el pseudoestroma blanco y esporulación (Bailey et al., 2018).

Figura 1

Ciclo de la enfermedad de Moniliophthora roreri en Theobroma cacao.



Autores: (Bailey et al., 2018).

Estrategias de control

Una de las estrategias de control que se realiza para evitar pérdida económica en cultivos de cacao en los diferentes países de Centro y Sur América, debido a enfermedades como la moniliasis, es el uso de productos químicos como los fungicidas basados en cobre, ya que, han demostrado ser eficientes en la remoción de la enfermedad, pues mejoran la producción de las mazorcas de cacao; sin embargo, este tipo de control puede generar altos costos y en algunos casos puede ser ineficaz, debido a la resistencia que pueden desarrollar los microorganismos a este tipo de compuestos, además del impacto negativo en la salud ambiental y humana. Otro tipo de control que se ha desarrollado en los cultivos de cacao es la fitosanidad o control cultural, que consiste en la remoción con signos de enfermedad. También se ha implementado la sustitución de árboles enfermos con variedades genéticamente resistentes, estrategia considerada viable, aunque puede generar un retraso en la producción por el largo ciclo de vida del cacao, más la posibilidad de la pérdida de resistencia contra estas enfermedades (Tirado-Gallego et al., 2016).

Aspergillus niger

Generalidades

Aspergillus es un género ampliamente distribuido de más de 250 especies de hongos filamentosos en gran parte saprofitos que pertenecen al filo Ascomycota. Originalmente descrito en 1729 por el botánico y sacerdote Antonio Micheli (Rokas, 2013).

Aspergillus niger es un hongo que se encuentra con frecuencia en climas más cálidos, tanto en situaciones de campo como en alimentos almacenados. Las esporas negras aparentemente brindan protección contra la luz solar y la radiación ultravioleta, lo que brinda una ventaja competitiva en tales hábitats, siendo un agente principal responsable de la pudrición poscosecha (Hocking, 2006).

Este microorganismo existe en gran medida como saprófito, lo que significa que obtienen su nutrición de una variedad de material muerto y en descomposición, como hojas, frutos y otra vegetación. Como tales, también contribuyen al retraso de varios productos alimenticios, dado que su fuente de vegetación está disponible en todas partes (Šimonovičová et al., 2021).

Taxonomía

Aspergillus niger presenta una mayor diversidad genética, reflejando una complejidad al momento de la identificación a nivel de especie.

Tabla 2.

Taxonomía de *Aspergillus niger*

Reino	Fungi
División	Ascomycota
Clase	Eurotiomycetes
Orden	Eurotiales
Familia	Trichocomaceae
Género	<i>Aspergillus</i>
Especie	<i>Aspergillus niger</i>

Autores: (Epa & of Pollution Prevention, 1997)

Morfología

Generalmente, tienen una apariencia algodonosa, inicialmente de blanco a amarillo y luego se vuelve negro. Está formado por conidióforos similares al fieltro; además, la observación macroscópica de las colonias en agar papa dextrosa a 25 °C es inicialmente blanca, que rápidamente se vuelve negra con la producción de conidios con un diámetro de 4-5 μm , el reverso es de color amarillo pálido y el crecimiento puede producir fisuras radiales en el agar (Mokobi, 2021).

Hábitat

Aspergillus niger es altamente termotolerante, por lo que puede prosperar en temperaturas extremas, incluidas condiciones extremadamente bajas y extremadamente altas. Está unido a su forma de reproducción asexual, lo que hace que se cultive en cualquier tipo de ambiente cuando las condiciones son favorables, por lo que también es oportunista; idealmente, vive en la vegetación en descomposición, como pilas de compost y hojas muertas, en el suelo y también se puede encontrar en muchos lugares, incluso en granos almacenados con granos almacenados, frutas secas, nueces secas y poliéster (Mokobi, 2021).

Ciclo de vida

Aspergillus niger se reproduce asexualmente formando esporas conidiales, el ciclo de vida comienza con la dispersión de los conidios sobre una plataforma con condiciones favorables de al menos 25-40°C; luego, los conidios germinan formando una célula vegetativa, dado que las células se desarrollan en micelio hifal que se ramifica dicotómicamente formando hifas aéreas. Posteriormente, Las hifas aéreas crecen para formar conidióforos que se hinchan en el ápice formando la parte vesicular del conidióforo y a partir de las vesículas, se forman los esterigmas primarios conocidos como fiálides, los mismos que formarán los esterigmas secundarios que comienzan a producir las esporas conidiales que se encuentran dispuestas en columnas (varias filas) sobre las fiálidas (Mokobi, 2021).

Capítulo III

Metodología

Ubicación del área de investigación

Ubicación política

País:	Ecuador
Provincia:	Pichincha
Cantón:	Puerto Quito
Parroquia:	Puerto Quito
Sector:	La Ceiba

Ubicación ecológica

Zona de vida:	Ecológica
Altitud:	Bosque húmedo tropical
Temperatura media:	25 °C
Precipitación:	2860 mm/año
Humedad relativa:	85%
Heliofanía:	680 horas luz/año
Suelos:	Francos arenosos

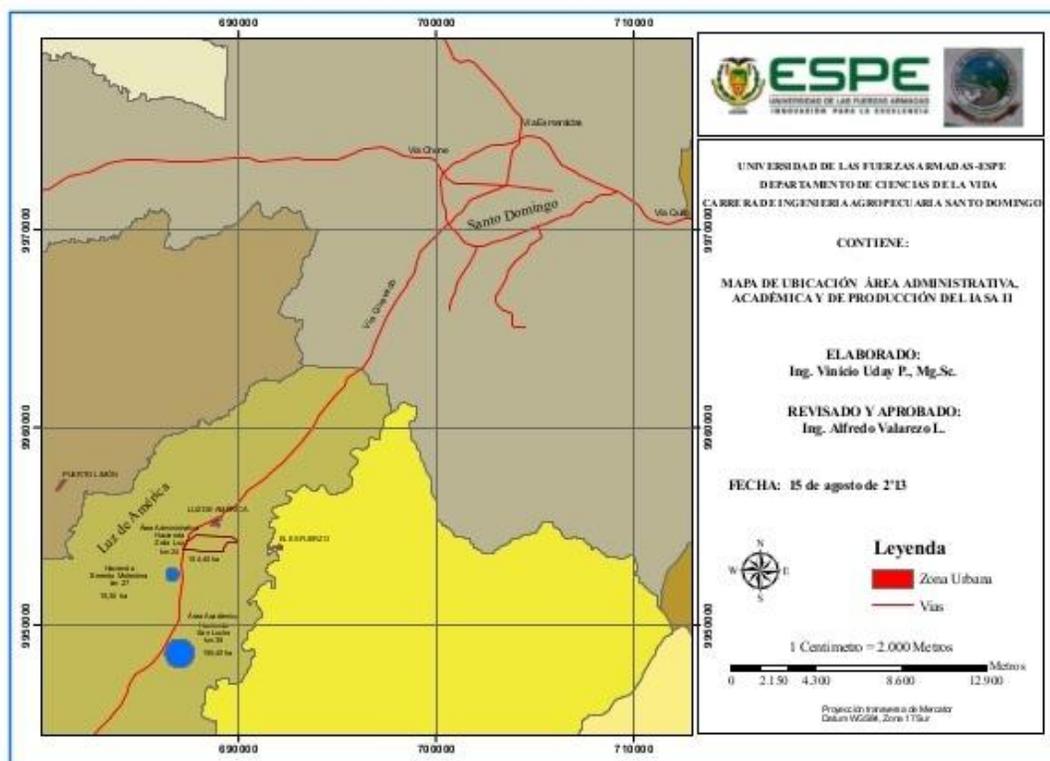
Ubicación geográfica

El trabajo de investigación se desarrolló en los laboratorios de la Universidad de las Fuerzas Armadas "ESPE", extensión Santo Domingo, Vía Santo Domingo – Quevedo Km 24, provincia Santo Domingo de los Tsáchilas, cantón Santo Domingo.

Latitud:	00° 24' 36"
Longitud:	79° 18' 43"
Altitud:	270 msnm

Figura 2

Mapa de ubicación geográfica del área de investigación



Materiales

Determinación de pH

Tabla 3

Recursos empleados para la determinación del pH

Equipos	Materiales/Insumos	Muestra
Potenciómetro	Probeta de 100 mL	Mucílago de cacao
Balanza	Pipeta de 10 mL	
	Vaso de precipitación de 200 mL	
	Varilla de vidrio	

Determinación de acidez titulable

Tabla 4

Recursos empleados para la determinación de acidez titulable

Equipos	Materiales/Insumos	Reactivos	Muestra
Potenciómetro	Probeta de 100 mL	NaOH 0,1N	Mucílago de cacao
Kit de titulación	Pipeta de 10 mL		
Agitador	Vaso de precipitación de 200 mL		
	Electrodo		

Determinación de sólidos solubles

Tabla 5

Recursos empleados para la determinación de sólidos solubles

Equipos	Materiales/Insumos	Muestra
Refractómetro	Vaso de precipitación de 200 mL	Mucílago de cacao

Aislamiento de bacterias ácido lácticas

Tabla 6

Recursos empleados para el aislamiento de bacterias ácido lácticas presentes en la fermentación

Equipos	Materiales/Insumos	Reactivos	Muestra
Balanza	Frascos para medios	MRS agar	Mucílago de cacao fermentado
Plancha térmica magnética	Placas de Petri	Agua peptona	
Autoclave	Tubos de ensayo		
Cámara de flujo laminar	Asa de Drigalski		
Incubadora	Asa bacteriológica		
	Mechero		
	Micropipeta		

Identificación de bacterias ácido lácticas

Tabla 7

Recursos empleados para la identificación de bacterias ácido lácticas

Equipos	Materiales/Insumos	Reactivos	Muestra
Microscopio	Portaobjetos	Cristal violeta	Mucílago de cacao fermentado
	Cubreobjetos	Lugol	
	Mechero	Alcohol acetona	
	Asa bacteriológica	Safranina	

Gotero	Aceite de Inmersión
Vaso de precipitación de 250 mL	Peróxido de hidrógeno

Recuento de poblaciones microbianas (BAL)

Tabla 8

Recursos empleados para el recuento de poblaciones microbianas (BAL)

Equipos	Materiales/Insumos	Reactivos	Muestra
Balanza	Tubos de ensayo	Agua peptona	Mucílago de cacao
Autoclave	Frascos para medios	Láminas de Petrifilm	
Cámara de flujo laminar	Mechero		
Vórtex	Micropipeta		
Incubadora	Probeta de 250 mL		
Contador de colonias	Vaso de precipitación de 200 mL		

Aislamiento de microorganismos patógenos (*Moniliophthora roreri* y *Aspergillus niger*)

Tabla 9

*Recursos empleados para el aislamiento de *Moniliophthora roreri* y *Aspergillus niger**

Equipos	Materiales/Insumos	Reactivos	Muestra
Balanza	Frascos para medios	PDA	Corteza de cacao
Plancha de agitación magnética	Probeta de 250 mL	Estreptomina	Almendras de cacao
Autoclave	Electrodo		

Cámara de flujo laminar	Placas de Petri
Incubadora	Mechero
	Bisturí
	Vaso de precipitación de 200 mL

Identificación de microorganismos patógenos (*Moniliophthora roreri* y *Aspergillus niger*)

Tabla 10

Recursos empleados para la identificación de Moniliophthora roreri y Aspergillus niger

Equipos	Materiales/Insumos	Reactivos	Muestra
Microscopio	Portaobjetos	Azul de lactofenol	Cultivo puro de <i>Moniliophthora roreri</i>
	Cubreobjetos	Aceite de inmersión	Cultivo puro de <i>Aspergillus niger</i>
	Mechero		
	Asa bacteriológica		
	Vaso de precipitación de 200 mL		

Determinación de actividad antimicrobiana de BAL frente a microorganismos patógenos (*Moniliophthora roreri* y *Aspergillus niger*)

Tabla 11

Recursos empleados para la inhibición de BAL frente a Moniliophthora roreri y Aspergillus niger

Equipos	Materiales/Insumos	Reactivos	Muestra
Autoclave	Frascos para medios	Mueller-Hinton Agar	Solución libre de células (SLC)
Incubadora	Electrodo	NaOH 1N	
Balanza	Asa bacteriológica		
Espectrofotómetro	Tubos de ensayo		
Centrífuga	Jeringas estériles		
Cámara de flujo laminar	Vaso de precipitación de 200 mL		
Potenciómetro	Micropipetas		
Vórtex	Placas de Petri		
	Discos de papel filtro (5mm)		
	Asa de Drigalski		
	Matraz de Erlenmeyer		
	Pinzas		
	Mechero		

Métodos

Obtención de la materia prima

La materia prima de las tres variedades de cacao (Forastero, Trinitario y CCN-51) fue recolectada en la finca de la Familia Chalar Mendoza, ubicada en el kilómetro 145 vía la Independencia-Puerto Quito. Se evaluó que las mazorcas de cacao se encuentren en un estado de maduración óptimo y libres de enfermedades.

Fermentación del mucílago de cacao

Se lavaron las mazorcas de cacao con agua potable y posteriormente pasaron a un proceso de desinfección, utilizando 20 mL de hipoclorito de sodio al 5% por cada litro de agua. Se separaron las almendras de la cáscara del cacao y se utilizó un lienzo para proceder a la filtración del mucílago (aproximadamente 1 litro). Finalmente se fermentó el mucílago de cacao en botellas de vidrio con su respectiva trampa de CO₂, las cuales fueron cubiertas con fundas negras y almacenadas en un espacio oscuro a temperatura ambiente por un tiempo de 72 horas.

Aislamiento de bacterias ácido lácticas

Se preparó agua peptona (1,5%) utilizando 2,43 g en un volumen de 162 mL de agua destilada, se realizaron diluciones seriadas hasta 10⁻⁶ y se inoculó 1 mL de la muestra de cacao fermentada en 9 mL de agua peptona. Se sembró 100 uL de cada dilución en MRS agar, realizando la técnica de extensión a una temperatura de incubación de 37 °C por un periodo de 48 horas.

Se purificaron las colonias formadas en un nuevo medio MRS agar, realizando una siembra por estrías.

Identificación de bacterias ácido lácticas

Preparación del frotis

Con un asa bacteriológica se transfirió una colonia bacteriana a un portaobjetos y se agregó una gota de agua destilada; se extendió la muestra hasta obtener una película delgada uniforme y se procedió a flamear el portaobjetos hasta que se seque completamente.

Tinción de Gram

Se agregó una gota de cristal violeta sobre la muestra fijada durante 60 segundos, posteriormente se añadió una gota de lugol durante 60 segundos, luego se colocó una gota de alcohol acetona durante 15 segundos y finalmente una gota de safranina por 60 segundos. Se enjuagó la muestra con agua destilada después de cada reactivo añadido.

Prueba de catalasa

Se agregó una gota de peróxido de hidrógeno (H_2O_2) en un portaobjetos, posteriormente, con el asa bacteriológica se inoculó una colonia bacteriana. Evidenciar la formación de burbujas antes de los 20 segundos (reacción positiva) y sin formación de burbujas (reacción negativa).

Secuenciación

Se prepararon los aislados de bacterias ácido lácticas en MRS agar, los cuales fueron enviados a la empresa Macrogen Inc. en Corea del Sur para su posterior análisis con respecto a la secuenciación del ARN ribosómico (ARNr) 16 S. Los resultados fueron comparados a través de la búsqueda de secuencias del programa Basic Local Alignment Search Tool (BLAST).

Siembra de cajas madre

Aislamiento de *Moniliophthora roreri*

Se realizaron pequeños cortes en la corteza de las mazorcas infectadas por *Moniliophthora roreri*, posteriormente, los trozos fueron desinfectados con hipoclorito de sodio al 1% por un minuto y se introdujeron en el medio SDA con estreptomycin (antibiótico). Las placas fueron incubadas a una temperatura de 28 °C por un periodo de 20 días. Se realizaron las resiembras necesarias hasta obtener un cultivo puro.

Aislamiento de *Aspergillus niger*

Las almendras con presencia de moho fueron desinfectadas con hipoclorito de sodio al 1% por un minuto y se introdujeron en el medio PDA con estreptomycin

(antibiótico). Las placas fueron incubadas a una temperatura de 28 °C por un periodo de 7 días. Posteriormente, se realizaron las resiembras necesarias hasta obtener un cultivo puro.

Identificación de Moniliophthora roreri y Aspergillus niger

Se agregó una gota de azul de lactofenol en un portaobjetos, luego se colocó una parte del micelio del hongo y se observaron las características microscópicas.

Actividad antimicrobiana

Solución libre de células (SLC)

Se preparó 10,71 g de caldo MRS en 200 mL de agua destilada por cada variedad de mucílago de cacao, se inocularon las bacterias ácido lácticas y se incubaron a una temperatura de 37 °C por un periodo de 24 horas.

Consecutivamente, se midió la absorbancia de las diferentes variedades en un espectrofotómetro Thermo Scientific a 600 nm y se transfirieron 10 mL de las muestras en cada tubo de ensayo hasta obtener un volumen total de 80 mL por variedad. Luego, se procedió a centrifugar a 10,000 xg a una temperatura de 4 °C por 20 minutos para precipitar las células bacterianas y se filtraron los sobrenadantes obtenidos.

Se aplicó el método de Kirby Bauer (prueba difusión en agar) para medir la sensibilidad de SLC frente a *Moniliophthora roreri* y *Aspergillus niger*, utilizando discos de papel filtro (5mm), los cuales se impregnaron en SLC durante 5 minutos y fueron inoculados de manera equidistante en Mueller-Hinton agar con los microorganismos patógenos previamente sembrados. Finalmente se incubaron a una temperatura de 30 °C por 48 horas.

Diseño Experimental

Factores del experimento

Tabla 12

Factores y Niveles a probar en la actividad antimicrobiana de las BAL frente a microorganismos patógenos

Factores	Simbología	Niveles
Variedad de mucílago de cacao (A)	a ₀ a ₁ a ₂	CCN-51 Trinitario Forastero
Microorganismos patógenos (B)	b ₀ b ₁	<i>Moniliophthora roreri</i> <i>Aspergillus niger</i>

Tratamientos a comparar

Tabla 13

Tratamientos a comparar en el efecto antimicrobiano de las BAL frente a microorganismos patógenos

Nº	Interacciones	Unidades experimentales.
T1	a0b0	CCN-51 + <i>Moniliophthora roreri</i>
T2	a0b1	CCN-51 + <i>Aspergillus niger</i>
T3	a1b0	Trinitario + <i>Moniliophthora roreri</i>
T4	a1b1	Trinitario + <i>Aspergillus niger</i>
T5	a2b0	Forastero + <i>Moniliophthora roreri</i>
T6	a2b1	Forastero + <i>Aspergillus niger</i>

Tipo de diseño experimental

Se aplicó un ANOVA DBCA con arreglo factorial AxB (3x2) con un total de 6 unidades experimentales y tres repeticiones por tratamiento. El modelo estadístico es el siguiente:

$$y_{ijk} = \mu + \alpha_i + \beta_j + (\alpha\beta)_{ij} + \epsilon_{ijk}$$

Donde:

μ = media global

α = efecto del nivel i-ésimo del factor A

β = efecto del nivel j-ésimo del factor B

$(\alpha\beta)_{ij}$ = efecto de la interacción doble del factor A por el factor B

ϵ_{ij} = error aleatorio

k = número de repeticiones del experimento

Repeticiones

Se realizaron tres repeticiones por tratamiento con un total de 18 unidades experimentales.

Análisis estadístico

Tabla 14

Esquema de análisis de varianza para el estudio de la actividad antimicrobiana de las BAL frente a microorganismos patógenos

Fuente de variación	Fórmula	Grados de libertad
Variedad de mucílago	a-1	2
Microorganismo patógeno	b-1	1

Variedad de mucílago x Patógeno	(a-1) (b-1)	2
Réplicas	r-1	2
Error experimental		10
Total	abr-1	17

Análisis funcional

Se aplicó la prueba de significancia de Tukey ($p < 0,05$) para las variables con resultados de significancia en el análisis de varianza.

Variables a medir

Determinación de pH

Para determinar la concentración del ión hidrógeno pH se siguió el procedimiento de la norma INEN 389 (SERVICIO ECUATORIANO DE NORMALIZACIÓN INEN, 1985). Se agregó 10 mL de mucílago de cacao y se adicionó 100 mL de agua destilada agitando previamente la muestra. El valor del pH fue medido con un potenciómetro digital.

Determinación de sólidos solubles

Para este parámetro se siguió el protocolo de la norma INEN 380 (SERVICIO ECUATORIANO DE NORMALIZACIÓN INEN, 1985b). Se agregó una gota de mucílago de cacao en el prisma del refractómetro y se realizó la lectura de sólidos solubles totales en grados Brix.

Determinación de acidez titulable

El procedimiento consistió en la norma INEN 381 (SERVICIO ECUATORIANO DE NORMALIZACIÓN INEN, 1985) utilizando el método potenciométrico. Se agregó 25 mL de mucílago de cacao y se aforó con agua destilada a 250 mL en un matraz volumétrico homogenizando adecuadamente. Se tomó 25 mL de la muestra preparada y

se midió el pH inicial con un potenciómetro; posteriormente se añadió la solución 0,1 N de hidróxido de sodio (NaOH) hasta alcanzar un pH de 6, se continuó adicionando la solución hasta obtener un pH de 7 y finalmente un pH de 8,3. Se registró el volumen consumido de la solución de NaOH.

Se determinó el volumen exacto de solución 0,1 N de NaOH consumido correspondiente a un pH de 8,1 por el método de interpolación.

La acidez titulable se determinó a través de la siguiente ecuación:

$$A = \frac{(V_1 N_1 M) 10}{V_2}$$

Donde:

A = g de ácido en 1000 mL de producto.

V_1 = mL de NaOH usados para la titulación de la alícuota.

N_1 = normalidad de la solución de NaOH.

M = peso molecular del ácido de referencia (0,064 de ácido cítrico)

V_2 = volumen de la alícuota tomada para el análisis

Recuento de poblaciones microbianas (BAL)

Se preparó 2.84 g de agua peptona (1,5%) en 189 mL de agua destilada, posteriormente se agregó 9 mL de agua peptona en cada tubo de ensayo y se esterilizó por 25 minutos en el autoclave. Se prepararon diluciones seriadas hasta 10^{-7} y se agregó 1 mL de muestra fresca de mucílago de cacao, homogenizando cada dilución en un vórtex.

Se inoculó 1 mL de la dilución 10^{-7} en láminas de petrifilm, las cuales fueron incubadas a una temperatura de 38 °C por 48 horas para bacterias y para hongos/levaduras a una temperatura de 28 °C por 72 horas.

Se utilizó la siguiente ecuación para determinar el número de colonias formadas (UFC).

$$\text{Recuento} \left(\frac{\text{UFC}}{\text{mL}} \right) = \frac{n \times f}{v}$$

Donde:

n = número de colonias

f = factor de dilución

v = volumen inoculado

Diámetro del halo de inhibición de SLC

Se aplicó el método de Kirby Bauer y se midió el diámetro del halo de inhibición de SLC para determinar el efecto antimicrobiano de las BAL, obtenidas de las diferentes variedades de mucílago de cacao frente a *Moniliophthora roreri* y *Aspergillus niger*.

Capítulo IV

Resultados

Análisis físico-químicos del mucílago de cacao

Análisis de varianza para la variable pH

Tabla 15

Análisis de varianza de la variable pH del mucílago de cacao fermentado

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
EFECTOS PRINCIPALES					
A: Variedad	0,7609	2	0,3805	2002	0,000000
B: Estado del mucílago	0,6460	1	0,6460	3400	0,000000
INTERACCIONES					
AB	0,0030	2	0,0015	8	0,008967
Réplicas	0,0000	2	0,0000	0	0,916715
Error	0,0019	10	0,0002		
Total	1,4119	17			

En la tabla 15 se muestra el análisis de varianza para la variable pH, en la cual, se observó diferencia significativa para el factor A (Variedad), factor B (Estado del mucílago) e interacción AB (Variedad*Estado del mucílago), mientras que, para las réplicas no existió diferencia significativa.

Análisis de varianza para la variable sólidos solubles

Tabla 16

Análisis de varianza de la variable sólidos solubles del mucílago de cacao fermentado

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
EFECTOS PRINCIPALES					
A: Variedad	24,834	2	12,417	2540	0,000000
B: Estado del mucílago	14,580	1	14,580	2982	0,000000
INTERACCIONES					
AB	0,523	2	0,262	54	0,000005
Réplicas	0,004	2	0,002	0	0,647228
Error	0,049	10	0,005		
Total	39,991	17			

En la tabla 16 se muestra el análisis de varianza para la variable sólidos solubles, en la cual, se observó diferencia significativa para el factor A (Variedad), factor B (Estado del mucílago) e interacción AB (Variedad*Estado del mucílago), mientras que, para las réplicas no existió diferencia significativa.

Análisis de varianza para la variable acidez titulable

Tabla 17

Análisis de varianza de la variable acidez del mucílago de cacao fermentado

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
EFFECTOS PRINCIPALES					
A: Variedad	0,551633	2	0,275817	827,45	0,000000
B: Estado del mucílago	0,283756	1	0,283756	851,27	0,000000
INTERACCIONES					
AB	0,007544	2	0,003772	11,32	0,002702
Réplicas	0,000133	2	0,000067	0,20	0,821927
Error	0,003333	10	0,000333		
Total	0,846400	17			

En la tabla 17 se muestra el análisis de varianza para la variable sólidos solubles, en la cual, se observó diferencia significativa para el factor A (Variedad), factor B (Estado del mucílago) e interacción AB (Variedad*Estado del mucílago), mientras que, para las réplicas no existió diferencia significativa.

Resultados del estudio de las variedades del mucílago del cacao (Factor A)

Tabla 18

Resultados del análisis de la prueba Tukey para el factor A en las variables físico-químicas

Factor A Variedad	pH	Sólidos solubles	Acidez
Trinitario	3,581667 ^A	18,10000 ^C	0,990000 ^C
CCN-51	3,998333 ^B	16,18333 ^B	0,601667 ^A
Forastero	4,035000 ^C	15,28333 ^A	0,638333 ^B

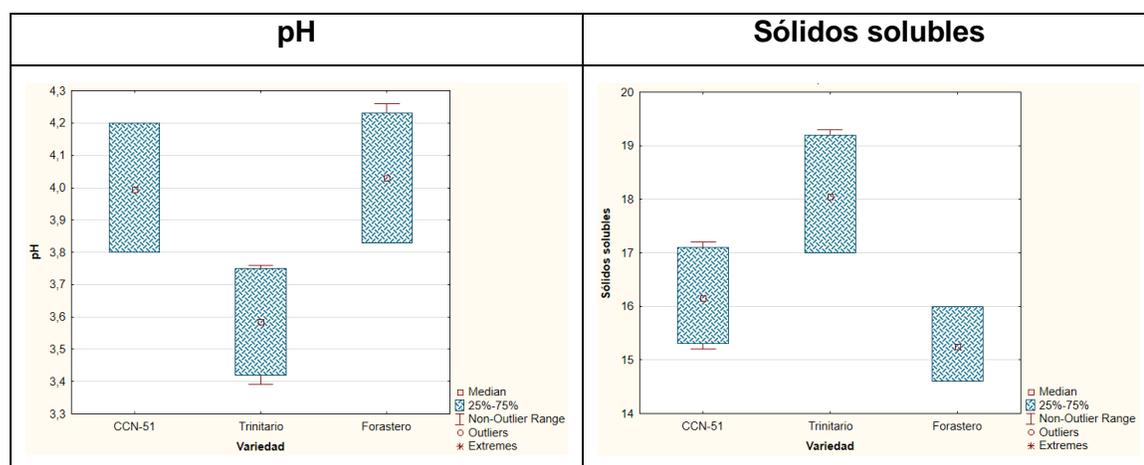
En la tabla 18 se muestra las diferencias entre las medias y la formación de tres grupos independientes; se observó un menor pH de 3,58 en la variedad Trinitario perteneciente al grupo A, seguido la variedad CCN-51 del grupo B presentó un pH de 3,99 y la variedad Forastero mostró un mayor pH de 4,03 correspondiente al grupo C.

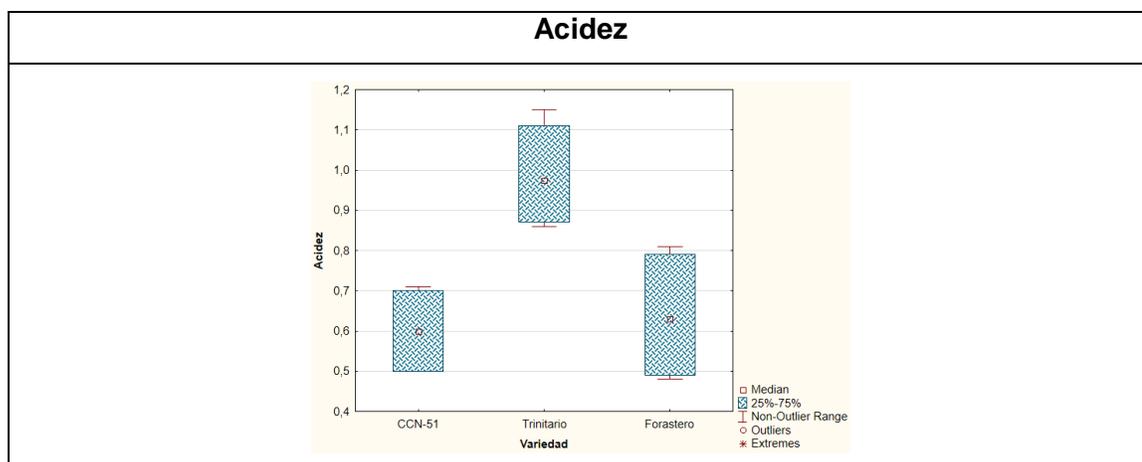
En cuanto al contenido de sólidos solubles, se observó la formación de tres grupos independientes, siendo menor en la variedad Forastero perteneciente al grupo A con un valor de 15,28, en la variedad CCN-51 del grupo B fue de 16,18 y la variedad Trinitario correspondiente al grupo C mostró un mayor contenido de sólidos solubles de 18,10.

Con respecto a la acidez titulable, también se identificó la formación de tres grupos independientes; la variedad CCN-51 perteneciente al grupo A presentó un valor menor siendo de 0,60%, en la variedad Forastero del grupo B fue de 0,63% y la variedad Trinitario correspondiente al grupo C mostró mayor valor de acidez de 0,99%.

Figura 3

Estudio del efecto de las variedades del mucílago de cacao (Factor A) en las variables de estudio





En la figura 3 se muestra las diferencias entre las medias de las variedades estudiadas; se observó un menor pH en la variedad Trinitario (3,58), seguido por CCN-51 (3,99), mientras que, Forastero presentó el pH más alto (4,03). En cuanto a los sólidos solubles, se observó un menor contenido en la variedad Forastero (15,28), seguido por la variedad CCN-51 (16,18), mientras que, Trinitario presentó un mayor contenido de sólidos solubles (18,10). Con respecto a la acidez titulable, se observó que la variedad CCN-51 presentó menor acidez (0,60%), seguido por la variedad Forastero (0,63%), mientras que, Trinitario mostró mayor acidez (0,99%).

Resultados del estudio sobre el estado del mucílago de cacao (Factor B)

Tabla 19

Resultados del análisis de la prueba Tukey para el factor B en las variables físico-químicas

Factor B Estado del mucílago	pH	Sólidos solubles	Acidez
Fermentado	4,061111 ^B	15,62222 ^A	0,617778 ^A
Fresco	3,682222 ^A	17,42222 ^B	0,868889 ^B

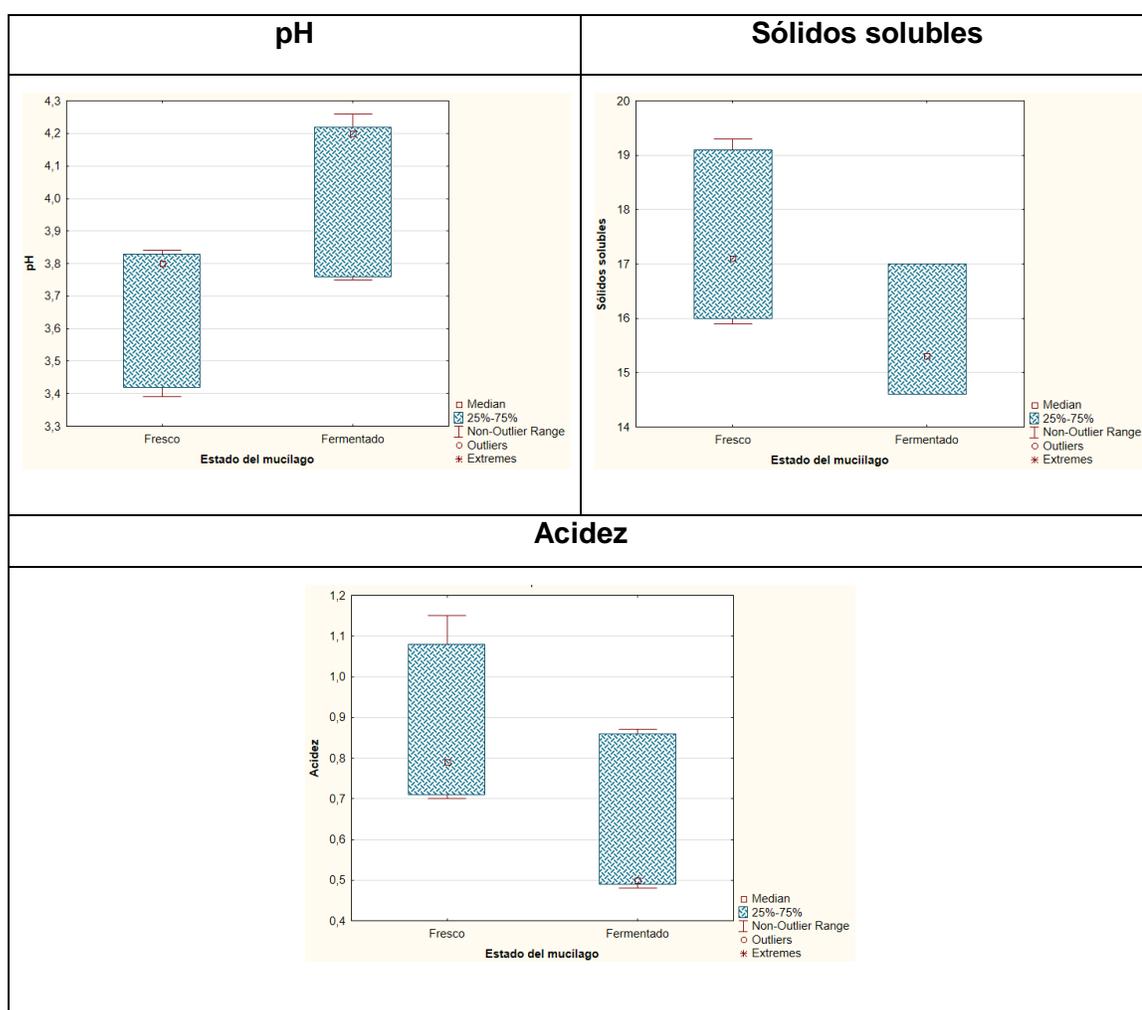
En la tabla 19 se muestra las diferencias entre las medias y la formación de dos grupos independientes; se observó que el pH del mucílago fresco de cacao del grupo A fue de 3,68 siendo menor que el de mucílago fermentado del grupo B, presentando un pH de 4,06.

En cuanto al contenido de sólidos solubles, se observó la formación de dos grupos independientes, en el cual, el mucílago fermentado de cacao del grupo A fue de 15,62 siendo menor que el de mucílago fresco del grupo B con un valor de 17,42.

Con respecto a la acidez titulable, también se identificó la formación de dos grupos independientes, el mucílago fermentado de cacao perteneciente del grupo A fue de 0,61% siendo menor que el de mucílago fresco del grupo B con un valor de 0,86%.

Figura 4

Estudio del efecto del estado del mucílago (Factor B) en las variables de estudio



En la figura 4 se muestra las diferencias entre las medias de las variedades estudiadas; se observó un menor pH en el mucílago fresco (3,68), mientras que, el mucílago fermentado presentó un mayor pH (4,06). En cuanto a los sólidos

solubles, se observó un menor contenido en el mucílago fermentado (15,62), mientras que, en el mucílago fresco hubo mayor contenido de sólidos solubles (17,42). Con respecto a la acidez titulable, se identificó que el mucílago fermentado tuvo menor acidez (0,61%), mientras que, el mucílago fresco presentó un valor más alto (0,86%).

Prueba de Tukey para la determinación de las interacciones significativas en los parámetros físico-químicos

Análisis de Tukey para la interacción A*B (Variedad*Estado del mucílago)

Tabla 20

*Resultados del análisis de la prueba Tukey para la interacción A*B para la variable pH*

Factor A Variedad	Factor B Estado del mucílago	pH
Trinitario	Fresco	3,410000 ^B
Trinitario	Fermentado	3,753333 ^C
CCN-51	Fresco	3,803333 ^A
Forastero	Fresco	3,833333 ^A
CCN-51	Fermentado	4,193333 ^D
Forastero	Fermentado	4,236667 ^E

Tabla 21

*Resultados del análisis de la prueba Tukey para la interacción A*B para la variable sólidos solubles*

Factor A Variedad	Factor B Estado del mucílago	Sólidos solubles
Forastero	Fermentado	14,60000 ^B
CCN-51	Fermentado	15,26667 ^C
Forastero	Fresco	15,96667 ^D
Trinitario	Fermentado	17,00000 ^A
CCN-51	Fresco	17,10000 ^A
Trinitario	Fresco	19,20000 ^E

Tabla 22

*Resultados del análisis de la prueba Tukey para la interacción A*B para la variable acidez titulable*

Factor A Variedad	Factor B Estado del mucílago	Acidez
Forastero	Fermentado	0,486667 ^A
CCN-51	Fermentado	0,500000 ^A
CCN-51	Fresco	0,703333 ^B
Forastero	Fresco	0,790000 ^C
Trinitario	Fermentado	0,866667 ^D
Trinitario	Fresco	1,113333 ^E

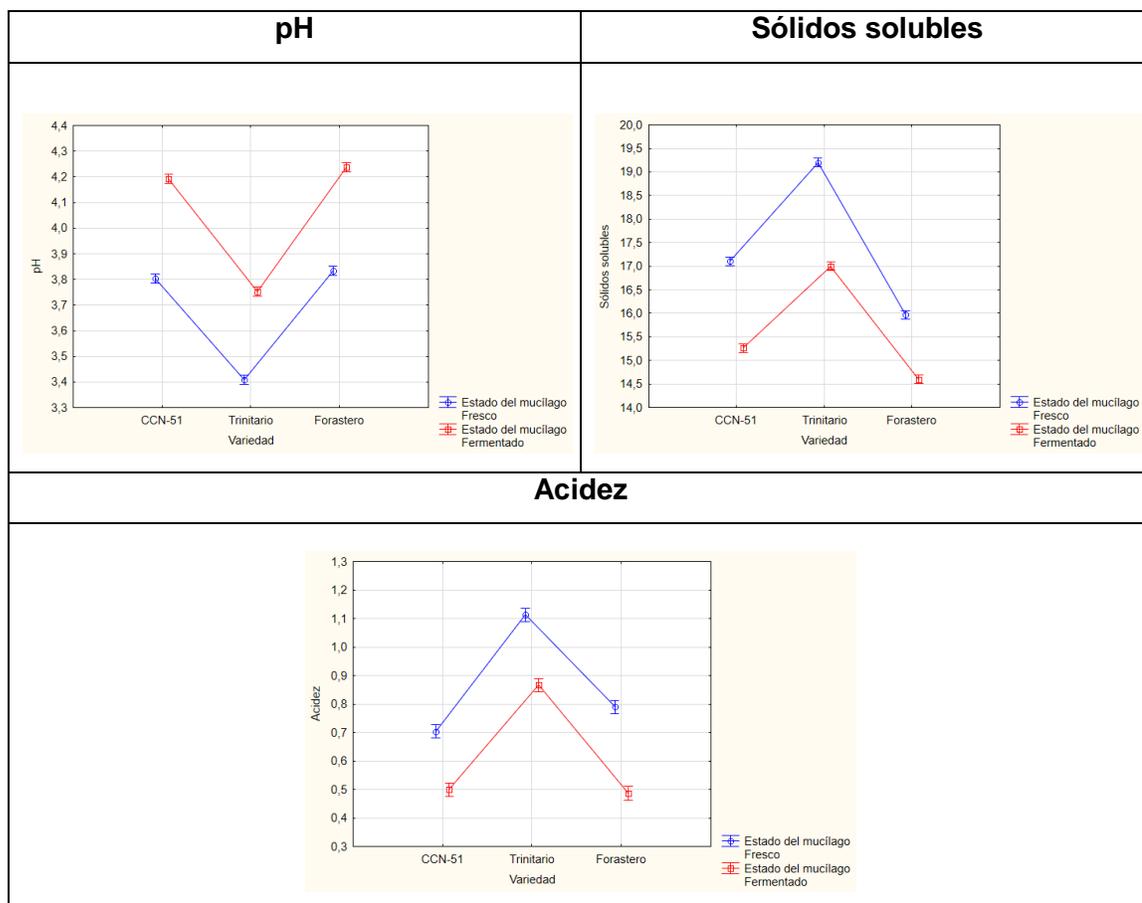
En la tabla 20 se muestra las diferencias entre las medias y la formación de cinco grupos independientes; se observó un menor pH en el grupo B perteneciente al mucílago fresco de la variedad Trinitario con un valor de 3,41, mientras que, el mucílago fermentado de la variedad Forastero presentó un mayor valor de 4,23 correspondiente al grupo E.

Como indica la tabla 21 con respecto a los sólidos solubles, se observó la formación de cinco grupos independientes; mostrando un menor contenido de sólidos solubles en el grupo B perteneciente al mucílago fermentado de la variedad Forastero con un valor de 14,60, mientras que, el mucílago fresco de la variedad Trinitario presentó un mayor valor de 19,20 correspondiente al grupo E.

La tabla 22 en relación a la acidez titulable, muestra la formación de cinco grupos independientes; se observó un menor valor de acidez titulable en el grupo A perteneciente al mucílago fermentado de la variedad Forastero con un valor de 0,48%, mientras que, el mucílago fresco de la variedad Trinitario presentó un mayor valor de 1,11% correspondiente al grupo E.

Figura 5

Estudio del efecto de la interacción A*B para los parámetros físico-químicos



En la figura 5, se muestra las diferencias entre las medias de la interacción (Variedades * Estado del mucílago); se observó que el estado del mucílago fresco en las tres variedades (Trinitario, Forastero y CCN-51) presentó un menor pH, mientras que, después de la fermentación existió un aumento. En cuanto a los sólidos solubles, se observó que, en el estado del mucílago fresco de las tres variedades, existió un mayor contenido de azúcar, mientras que, después de la fermentación el contenido de sólidos solubles disminuyó. Así mismo, la acidez titulable fue mayor en el mucílago fresco de las tres variedades y disminuyó después de la fermentación.

Parámetros microbiológicos del mucílago de cacao

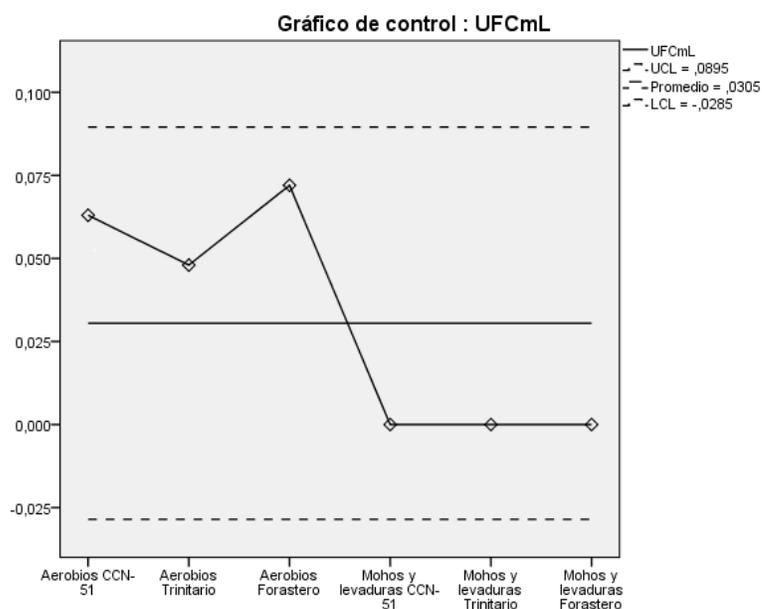
Se analizaron los parámetros microbiológicos de las diferentes variedades de mucílago de cacao, con la finalidad de conocer la cuantificación de los microorganismos presentes en la muestra fresca. Los resultados se presentan en la tabla 23.

Tabla 23

Recuento de poblaciones microbianas

Parámetro analizado	CCN-51	Trinitario	Forastero
Aerobios	$6,3 \times 10^{-2}$ UFC/mL	$4,8 \times 10^{-2}$ UFC/mL	$7,2 \times 10^{-2}$ UFC/mL
Mohos y levaduras	0	0	0

Figura 6 Gráfico de control del recuento microbiológico de las diferentes variedades de mucílago fresco de cacao



En la figura 6, se observó la presencia de aerobios en las tres variedades de mucílago de cacao, mostrando una menor población bacteriana de 0,048 UFC/mL para Trinitario, seguido de 0,063 UFC/mL para CCN-51 y mayor de 0,072 UFC/mL para

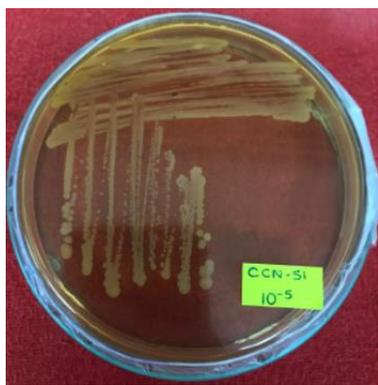
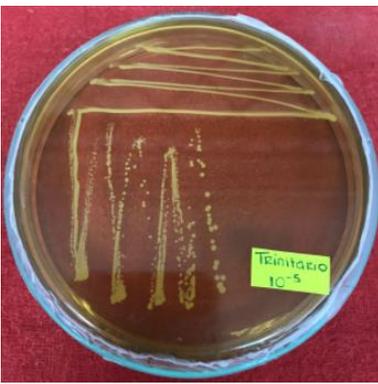
Forastero. Mientras que, no se evidenció presencia de Mohos y levaduras para ninguna variedad de mucílago fresco de cacao.

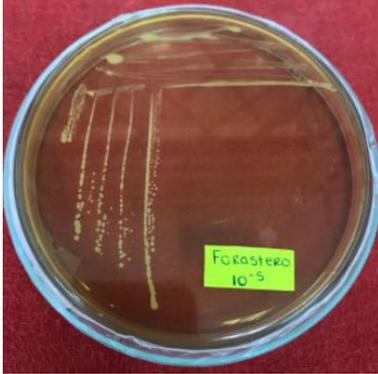
Caracterización morfológica macroscópica

Se identificaron las características morfológicas de las BAL aisladas a nivel macroscópico descritas en la tabla 24, en la cual, se observaron colonias redondas de coloración blanquecina y de textura cremosa.

Tabla 24

Características morfológicas de las tres variedades de mucílago de cacao

Variedad	Cepa Bacteriana	Características
CCN-51		<p>Forma: Circular Tamaño: 2 – 3 mm Color: Blanco Textura: Cremosa</p>
Trinitario		<p>Forma: Circular Tamaño: 1 - 2 mm Color: Blanco Textura: Cremosa</p>

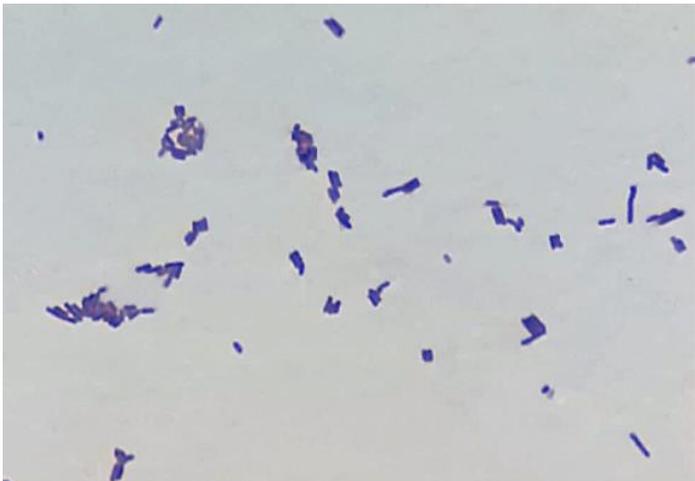
Forastero		Forma: Circular Tamaño: 0,5 - 1 mm Color: Blanco Textura: Cremosa
-----------	--	--

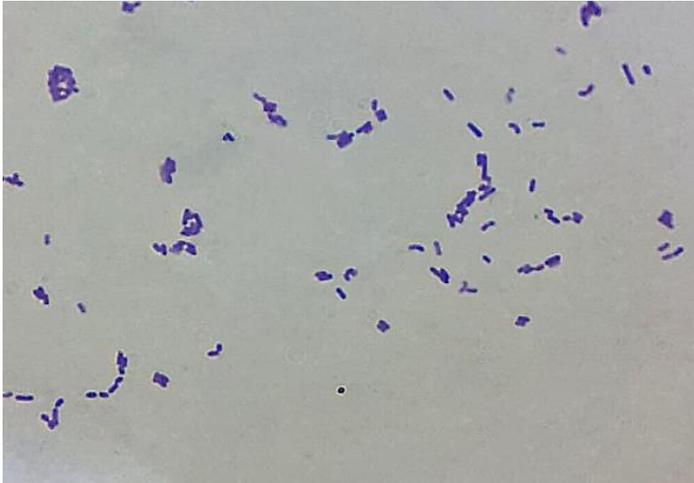
Identificación de bacterias ácido lácticas (BAL) producidas por la fermentación del mucílago de cacao

Se caracterizó la morfología de las colonias bacterianas utilizando la técnica de tinción de Gram, en la cual, se observaron agrupaciones de microorganismos y la forma de las células bacterianas como se muestra en la tabla 25. Se determinó que las bacterias aisladas a través de la fermentación de las diferentes variedades de mucílago de cacao fueron Gram positivos – bacilos.

Tabla 25

Caracterización morfológica microscópica de (BAL)

Variedad	Cepa Bacteriana	Características
CCN-51		Gram + Bacilo

Trinitario		Gram + Bacilo
Forastero		Gram + Bacilo

Se realizó la identificación bioquímica aplicando la prueba de catalasa de las BAL (catalasa negativa), por lo cual, se empleó este método para determinar si cumplieron con esta característica. Se muestran los resultados en la tabla 26, observando que las BAL de las tres variedades de mucílago de cacao presentaron una reacción negativa al no detectar formación de burbujas.

Tabla 26*Prueba de catalasa*

Variedad	Catalasa
CCN-51	(-)
Trinitario	(-)
Forastero	(-)

Secuenciación

Los resultados de la secuenciación en la herramienta BLAST dieron como resultado las siguientes especies:

Tabla 27*Resultados de la secuenciación*

Código	Bacteria	Homología
CCN-51	<i>Lactobacillus fermentum</i>	97%
Trinitario	<i>Lactobacillus fermentum</i>	99%
Forastero	<i>Lactobacillus plantarum</i>	99%

Caracterización morfológica de microorganismos patógenos

Se identificaron las características morfológicas a nivel macroscópico de las cepas fúngicas aisladas. En cuanto a *Moniliophthora roreri*, se observó una colonia redonda con una coloración marrón, mientras que, en *Aspergillus niger* se observaron colonias en CYA de coloración negra. Los resultados se muestran descritos en la tabla 28.

Tabla 28

Características morfológicas macroscópicas de las cepas fúngicas de *Moniliophthora roreri* y *Aspergillus niger*

Microorganismo Patógeno	Cepa Fúngica	Características
<i>Moniliophthora roreri</i>		<p>Forma: Colonia redonda Color: Beige a marrón Aspecto: Pulverulento Textura: Afelpada</p>
<i>Aspergillus niger</i>		<p>Forma: Colonias en CYA Color: Negro Aspecto: Pulverulento Textura: Aterciopelada</p>

Se determinaron las características microscópicas de las cepas fúngicas aisladas. Con respecto a *Moniliophthora roreri* se observaron hifas hialinas septadas con conidias ovoides, mientras que, en *Aspergillus niger* se observaron conidióforos de pared lisa, con una vesícula globosa de coloración marrón a negro como se muestra descritos en la tabla 29.

Tabla 29

Identificación microscópica de los microorganismos patógenos

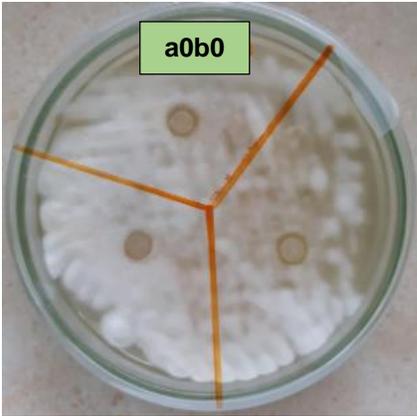
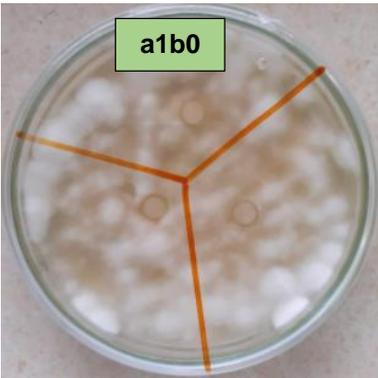
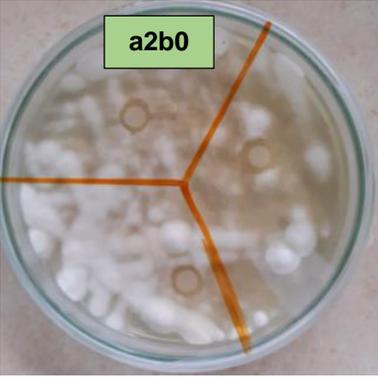
Microorganismo Patógeno	Cepa Fúngica	Características
<i>Moniliophthora roreri</i>		<ul style="list-style-type: none"> • Hifas hialinas septadas • Conidias ovoides
<i>Aspergillus niger</i>		<ul style="list-style-type: none"> • Conidióforos de pared lisa • Vesícula globosa • Conidios globosos • Color marrón a negro • Esporas

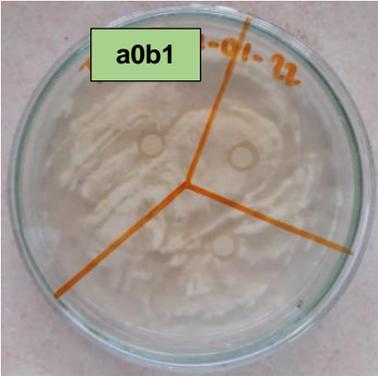
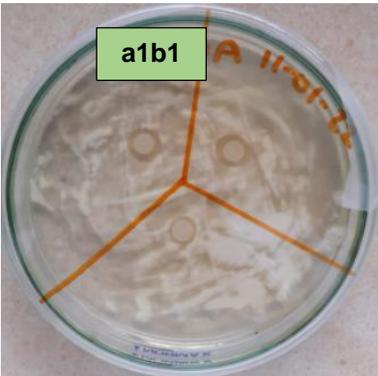
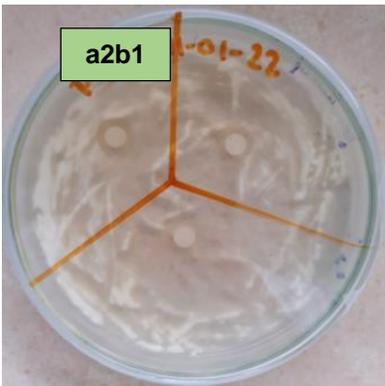
Inhibición de SLC frente a microorganismos patógenos

La tabla 30 muestra el diámetro de inhibición (mm) de los diferentes tratamientos, los cuales se realizaron por triplicado, empleando el método de Kirby Bauer para determinar la sensibilidad de los microorganismos patógenos de interés frente a la SLC de las BAL. Se identificó que la SLC de la variedad Forastero presentó mayor inhibición, tanto para *Moniliophthora roreri* como para *Aspergillus Niger* en comparación a la SLC de las variedades CCN-51 y trinitario.

Tabla 30

Antibiograma por el método de Kirby Bauer de la SLC de las diferentes variedades de mucílago de cacao frente a microorganismos patógenos

Variedad / Microorganismo	Antibiograma	Diámetro de inhibición (mm)
CCN-51/ <i>Moniliophthora roreri</i>		<ul style="list-style-type: none"> • R1: 7,5 • R2: 7 • R3: 7
Trinitario/ <i>Moniliophthora roreri</i>		<ul style="list-style-type: none"> • R1: 9 • R2: 7 • R3: 7
Forastero/ <i>Moniliophthora roreri</i>		<ul style="list-style-type: none"> • R1: 8,5 • R2: 10 • R3: 9

<p>CCN-51/ <i>Aspergillus Niger</i></p>		<ul style="list-style-type: none">• R1: 9• R2: 9,5• R3: 9
<p>Trinitario/ <i>Aspergillus Niger</i></p>		<ul style="list-style-type: none">• R1: 10,5• R2: 10,5• R3: 9
<p>Forastero/ <i>Aspergillus Niger</i></p>		<ul style="list-style-type: none">• R1: 11• R2: 10,5• R3: 11,5

Análisis de varianza del diámetro de inhibición

Tabla 31

Análisis de varianza de la inhibición de las BAL frente a los microorganismos patógenos

Fuente	Suma de Cuadrados	GI	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
EFFECTOS PRINCIPALES					
A: Variedad	11,361	2	5,681	10,541	0,003447
B: Patógeno	19,014	1	19,014	35,284	0,000143
INTERACCIONES					
AB	0,194	2	0,097	0,180	0,837584
Réplicas	0,778	2	0,389	0,722	0,509617
Error	5,389	10	0,539		
Total	36,736	17			

En la tabla 31 se muestra el análisis de varianza de la inhibición de las BAL, en la cual, se observó diferencia significativa para el factor A (Variedad) y factor B (Patógeno), mientras que, para la interacción AB (Variedad*Patógeno) y réplicas, no existió diferencia significativa.

Prueba de significancia de Tukey para los factores de estudio en la actividad antimicrobiana

Resultados del estudio de las variedades del mucílago del cacao (Factor A) para su inhibición

Tabla 32

Resultados del análisis de la prueba Tukey para el factor A en la variable inhibición

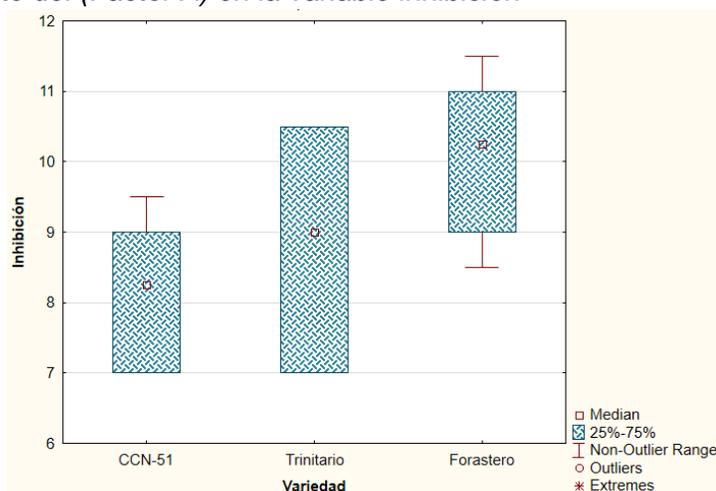
Variedad	Inhibición
CCN-51	8,16667 ^A
Trinitario	8,83333 ^A
Forastero	10,08333 ^B

En la tabla 32 se muestra las diferencias entre las medias y la formación de dos grupos independientes; se observó un menor diámetro de inhibición correspondiente al

grupo A de las variedades CCN-51 con un valor de 8,16 mm y Trinitario con 8,83 mm, mientras que, la variedad Forastero perteneciente al grupo B presentó un mayor diámetro de inhibición de 10,08 mm.

Figura 7

Estudio del efecto del (Factor A) en la variable inhibición



En la figura 7 se muestra las diferencias entre las medias de las variedades estudiadas; se observó que la variedad CCN-51 tiene una menor inhibición (8.16 mm), seguido Trinitario (8,83 mm), mientras que, la variedad Forastero presentó una mayor inhibición (10,08 mm).

Resultados del estudio de los patógenos (Factor B) para su inhibición

Tabla 33

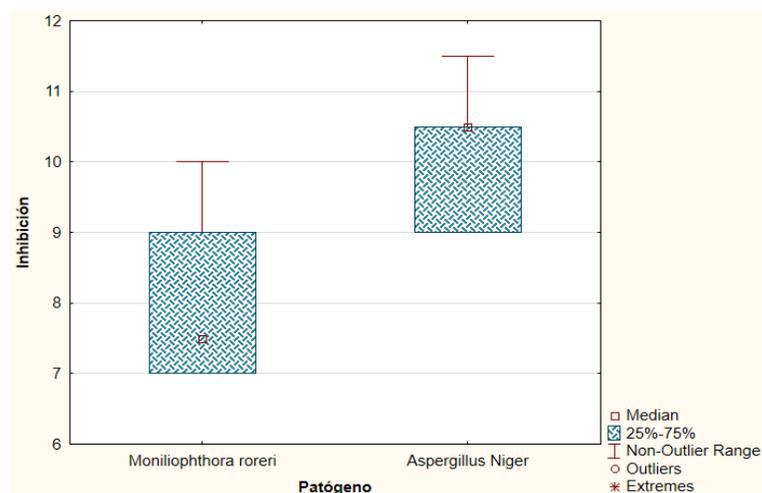
Resultados del análisis de la prueba Tukey para el factor B en la variable inhibición

Patógeno	Inhibición
<i>Moniliophthora roreri</i>	8,00000 ^A
<i>Aspergillus Niger</i>	10,05556 ^B

En la tabla 33 se muestra las diferencias entre las medias y la formación de dos grupos independientes; se identificó que el microorganismo *Moniliophthora roreri* perteneciente al grupo A, tuvo una menor inhibición de 8 mm, mientras que, *Aspergillus Niger* del grupo B un mayor diámetro de 10,05 mm.

Figura 8

Estudio del efecto del Factor B en la variable inhibición



En la figura 8 se muestra las diferencias entre las medias de los microorganismos patógenos; se observó que *Moniliophthora roreri* tuvo una menor inhibición (8,00 mm), mientras que, *Aspergillus niger* presentó mayor inhibición (10,05 mm).

Prueba de Tukey para la determinación de la interacción significativa en la actividad antimicrobiana

Ánalysis de Tukey para la interacción A*B (Variedad*Patógeno)

Tabla 34

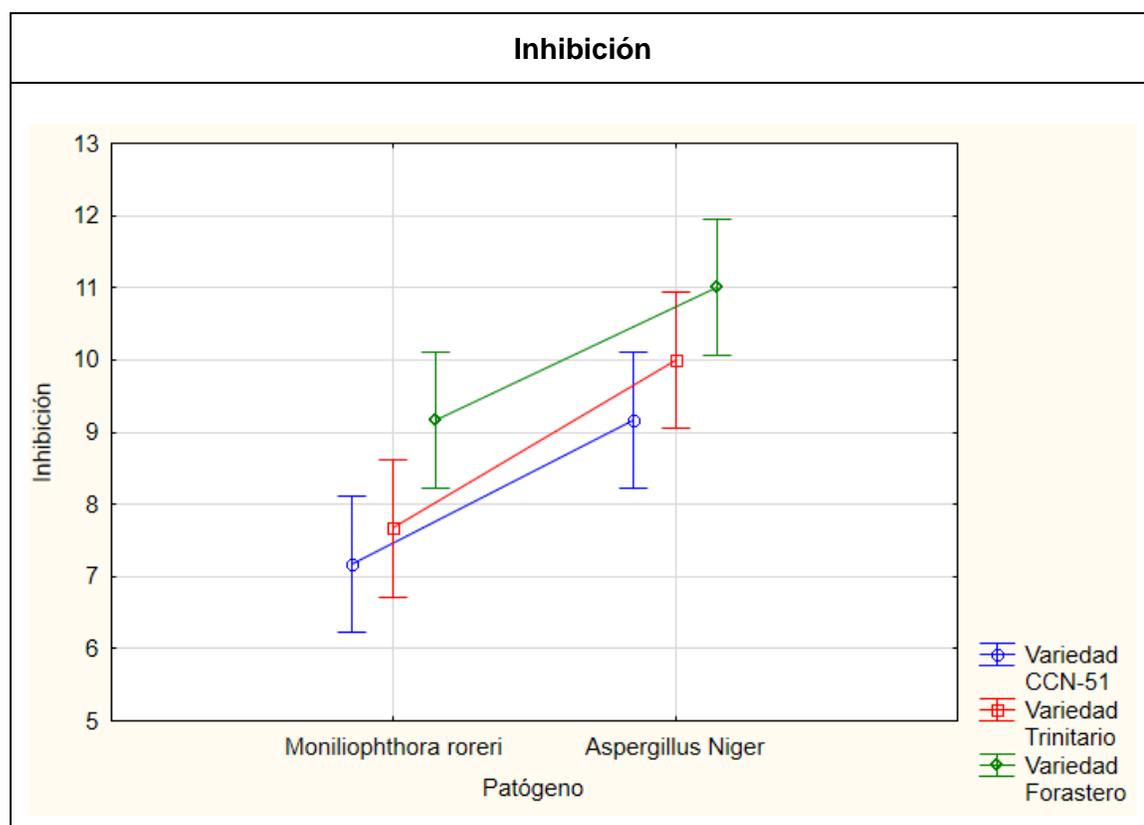
Resultados del análisis de la prueba Tukey para la interacción A*B en la variable inhibición

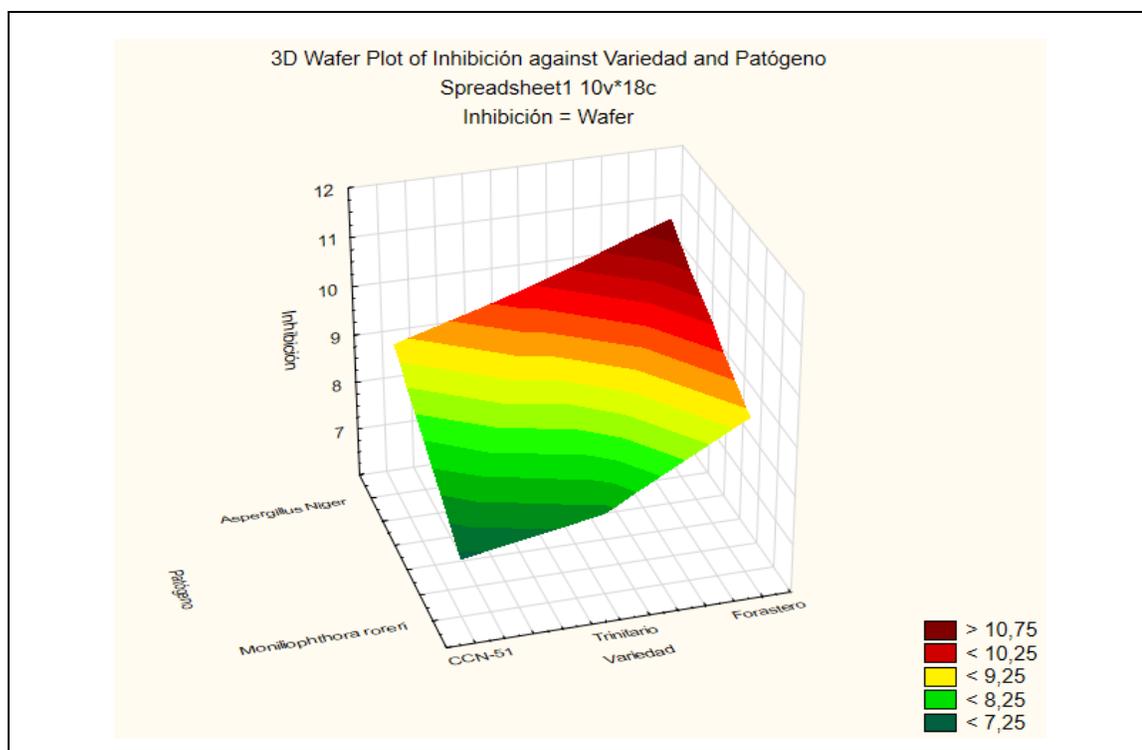
Factor A (Variedad)	Factor B (Patógeno)	Inhibición (mm)
CCN-51	<i>Moniliophthora roreri</i>	7,16667 ^A
Trinitario	<i>Moniliophthora roreri</i>	7,66667 ^A
Forastero	<i>Moniliophthora roreri</i>	9,16667 ^{AB}
CN-51	<i>Aspergillus Niger</i>	9,16667 ^{AB}
Trinitario	<i>Aspergillus Niger</i>	10,00000 ^B
Forastero	<i>Aspergillus Niger</i>	11,00000 ^B

En la tabla 34 se muestra las diferencias entre las medias y la formación de dos grupos independientes; se observó una menor inhibición en el grupo A perteneciente a las variedades CCN-51 con un valor de 7,16 mm y Trinitario de 7,66 mm frente a *Moniliophthora roreri*, mientras que, en el grupo B perteneciente a las variedades Trinitario y Forastero mostraron un mayor diámetro de inhibición frente a *Aspergillus niger* con valores de 10 y 11 mm respectivamente.

Figura 9

*Estudio del efecto de la interacción A*B en la variable inhibición*



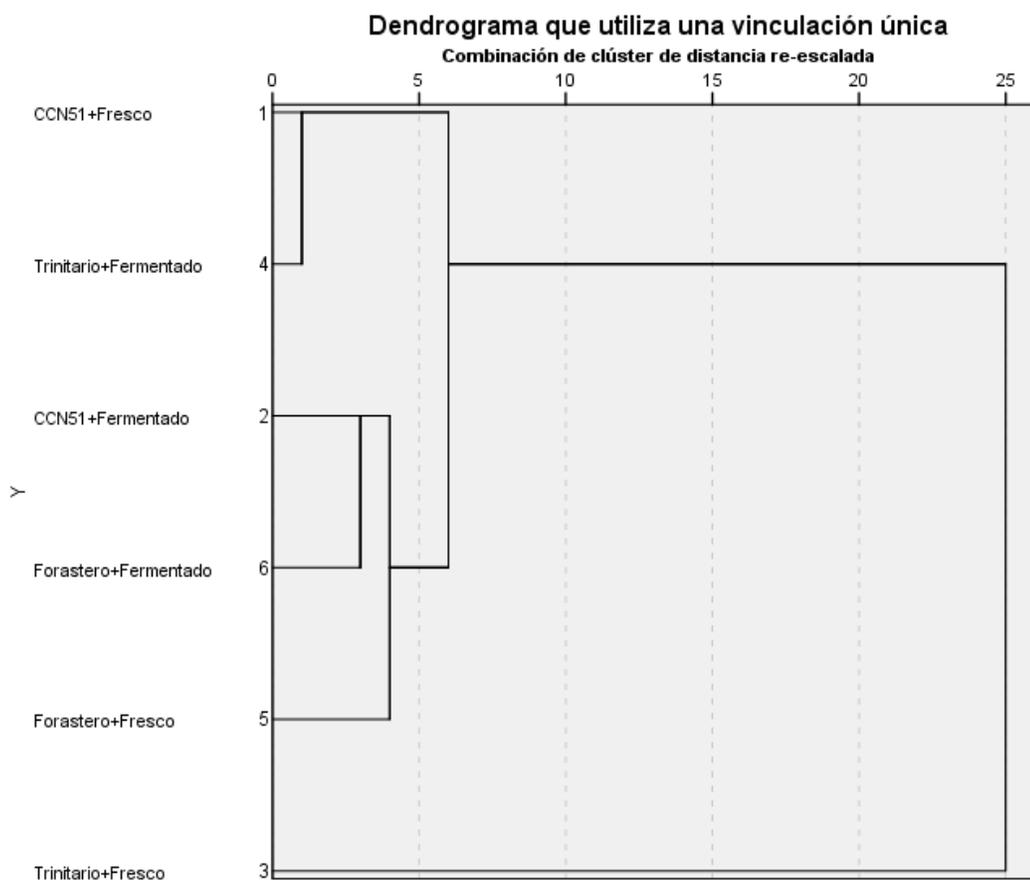


En la figura 9 se muestra el gráfico de respuesta con respecto a la variable inhibición, en la cual, se evidenció que la SLC de la variedad CCN-51 presentó una menor inhibición frente a *Moniliophthora roreri* y *Aspergillus niger*, mientras que, la SLC de la variedad Forastero presentó un mayor diámetro de inhibición en los dos tipos de microorganismos patógenos. En cuanto al gráfico de superficie, se identificó que los valores más representativos se ubican en la parte superior derecha del gráfico representados de color rojo intenso, destacándose la variedad Forastero frente a *Aspergillus niger*, mientras que, los valores más bajos se localizan en la parte inferior izquierda, indicando una menor incidencia en la variedad CCN 51 frente a *Moniliophthora roreri* representados de color verde intenso.

Análisis de conglomerados

Figura 10

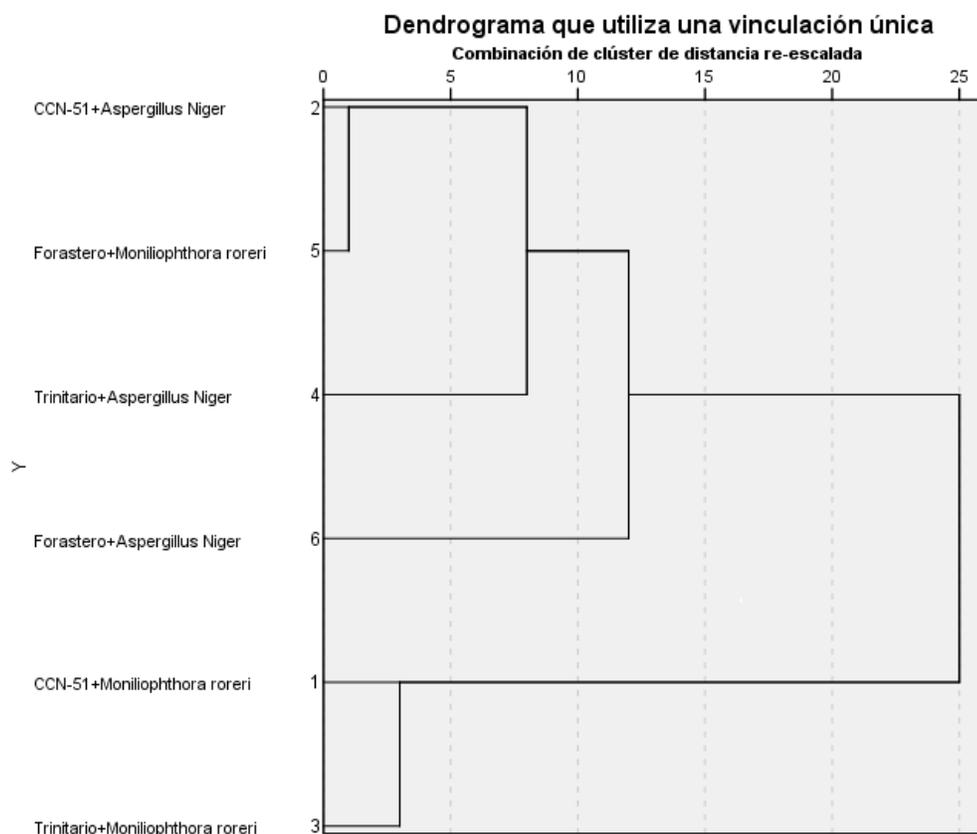
Dendrograma para los parámetros físico-químicos



En la figura 10 se muestra la formación de conglomerados de grupos vecinos más cercanos de las variables físico-químicas evaluadas (pH, sólidos solubles y acidez) de acuerdo a la variedad del mucílago de cacao, en el cual existió similitud entre CCN-51 + mucílago fresco y Trinitario + mucílago fermentado; a su vez, estas tienen una relación más distante con Forastero + mucílago fermentado. Por otro lado, también se identificó una estrecha relación entre CCN-51 + mucílago fermentado y Forastero + mucílago fermentado; así mismo, presentaron una relación más lejana con Forastero + mucílago fresco.

Figura 11

Dendrograma para la actividad antimicrobiana de las BAL frente a los patógenos



En la figura 11 se muestra la formación de conglomerados de grupos vecinos más cercanos de la inhibición de las BAL, de acuerdo a los microorganismos patógenos, en el cual se existió similitud entre CCN-51 + *Aspergillus niger* y Forastero + *Moniliophthora roreri*; a su vez, estas tuvieron una relación más distante con Trinitario + *Aspergillus niger*, mientras que, también hubo similitud entre CCN-51 + *Moniliophthora roreri* y Trinitario + *Moniliophthora roreri*.

Análisis de componentes principales para parámetros físico-químicos

Tabla 35

Matriz de correlaciones de componentes principales

		pH	Sólidos solubles	Acidez Titulable
Correlación	pH	1,000	-0,966	-0,978
	Sólidos solubles	-0,966	1,000	0,927
	Acidez Titulable	-0,978	0,927	1,000

La tabla 35 muestra una alta correlación entre las tres variables de los parámetros físico-químicos; identificando una correlación directa para sólidos solubles y acidez titulable, mientras que, pH presentó una correlación inversa.

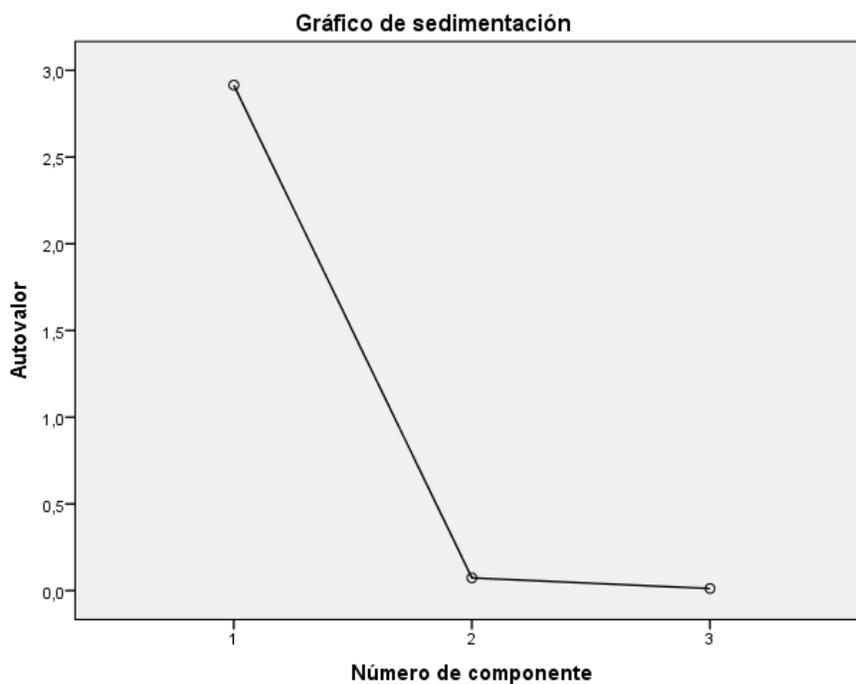
Tabla 36

Matriz de componentes

	Componente		
	1	2	3
pH	-0,996	0	0
Sólidos solubles	0,983	-0,177	0
Acidez Titulable	0,978	0,204	0

Tabla 37*Porcentaje de varianza total explicada*

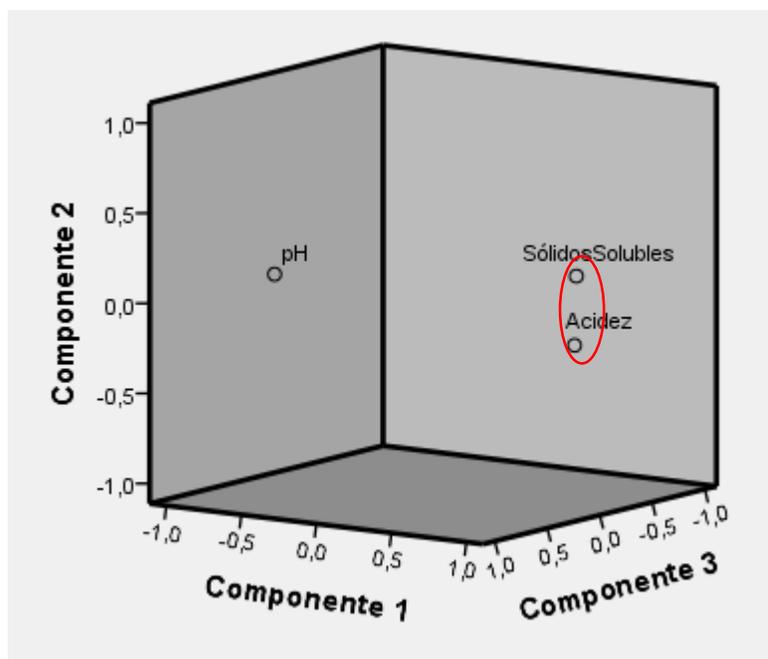
Componente	Varianza total explicada					
	Autovalores iniciales			Sumas de extracción de cargas al cuadrado		
	Total	% de varianza	% acumulado	Total	% de varianza	% acumulado
1	2,915	97,154	97,154	2,915	97,154	97,154
2	0,073	2,446	99,600	0,073	2,446	99,600
3	0,012	0,400	100,000	0,012	0,400	100,000

Figura 12*Gráfica de sedimentación*

En la figura 12 se evaluaron tres variables, de las cuales, según la varianza total explicada el pH tuvo mayor porcentaje de 97,15%, mientras que, el contenido de sólidos solubles presentó un valor de 2,44% y la acidez titulable fue de 0,4%.

Figura 13

Gráfica de componentes principales



La figura 13 indica las correlaciones de los componentes de las variables físico-químicas; en el componente 2 se muestra la variable pH y en el componente 3 se encuentran las variables sólidos solubles y acidez, las cuales presentaron una correlación directa entre sí, mientras que, el pH tuvo una correlación inversa frente a sólidos solubles y acidez titulable.

Capítulo V

Discusión

Recuento microbiano

En el recuento de poblaciones microbianas obtenidas del mucílago fresco de cacao, se identificó una baja concentración bacteriana (aerobios) en las tres variedades, siendo de $6,3 \times 10^{-2}$ UFC/mL para CCN-51, $4,8 \times 10^{-2}$ UFC/mL Trinitario y $7,2 \times 10^{-2}$ UFC/mL Forastero, mientras que, no se observó crecimiento de mohos y levaduras. Los autores Inés et al., (2012) mencionan que el recuento de aerobios mesófilos del mucílago fresco puede ser un indicador de la calidad y manipulación del sustrato a fermentar. Por otro lado, el mucílago de cacao es estéril y rico en carbohidratos, el cual rodea los granos de cacao en las vainas de la fruta y se contamina rápidamente por los microorganismos presentes en el medio ambiente después de abrir las vainas (Papalexandratou & De Vuyst, 2011). El estudio realizado por Vallejo et al., (2016) presentó similitud con los datos obtenidos, ya que evidenció presencia de aerobios con una concentración $1,2 \times 10^4$ UFC/g, mientras que, hubo ausencia de mohos y levaduras.

Parámetros físico-químicos

Variedades de mucílago de cacao (Factor A)

El pH de las tres variedades de mucílago de cacao es ácido, siendo de 3,58 para la variedad Trinitario, 3,99 para CCN-51 y 4,03 para Forastero, mostrando un comportamiento típico en el proceso de maduración, ya que la pulpa del cacao al ser de bajo pH, es un producto catalogado como altamente ácido ($\text{pH} < 4,5$) al igual que las mayorías de frutas tropicales (Nunes et al., 2020). Los resultados obtenidos del presente estudio son similares al de los autores Sánchez Olaya et al., (2019) con un pH de 3,87 para la variedad CCN-51, mientras que, en la investigación de Graziani de Fariñas et al., (2003) mostraron un pH de 3,45 para Trinitario y de 3,56 para Forastero. Por otro lado, los autores (De Vuyst & Weckx, 2016) mencionan que el mucílago de cacao tiene un bajo pH (3,0 – 4) debido a la presencia de pectina, sacáridos y ácido cítrico respectivamente.

Con respecto a los sólidos solubles totales, es el parámetro más común utilizado como indicador de madurez en la fruta y dependen de factores genéticos como se encontró en este estudio; también se ven afectados por las condiciones ambientales, la

composición del suelo, la disponibilidad de agua y las prácticas agronómicas, lo cual puede acelerar o retardar la conversión del almidón en azúcar (Rojas et al., 2020). En este estudio, la concentración de sólidos solubles totales, determinada a través del valor de °Brix, alcanzó valores de 15,28 para la variedad Forastero, 16,18 para CCN-51 y 18,10 para Trinitario, mostrando un alto contenido en azúcar. Los resultados de la variedad CCN-51 mostraron valores similares en comparación al estudio realizado por Vallejo et al., (2016) siendo de 16 °Brix, mientras que, en el estudio de Santana et al., (2018) se obtuvo un valor de 15,7 °Brix para Trinitario y según la investigación de Graziani de Fariñas et al., (2003) evidenciaron un valor más bajo de 12,47 °Brix para la variedad Forastero.

En cuanto a la acidez, es un parámetro más confiable que el pH durante el establecimiento de la madurez, ya que no se ve afectado por sustancias amortiguadoras (Moreno-Escamilla et al., 2018). La acidez titulable en este estudio fue baja en las tres variedades, presentando valores de 0,60% para la variedad CCN-51, seguido de 0,63% para Forastero y 0,99% para Trinitario, mientras que, en la investigación de Santana et al., (2018) evidenciaron un valor menor de 0,88% para trinitario, al igual que en el estudio de Vallejo et al., (2016) donde mostraron un valor más alto para CCN-51, siendo de 0,91%. Por otro lado, Peláez et al., (2016) obtuvieron un valor más alto en la variedad forastero de 0.96 %. Los autores (Vallejo et al., 2016) mencionan que la acidez en los alimentos se encuentra relacionado con los grupos carboxílicos e hidrogenados presentes en el ácido predominante, en este caso, el ácido cítrico.

Estado del mucílago (Factor B)

Se identificó que el pH del mucílago fresco es más bajo, obteniendo un valor de 3,68, mientras que, existió un aumento en la fermentación a 4,06 debido a una alta concentración de ácido cítrico, presentando una similitud con el estudio realizado por Peláez et al., (2016), ya que mostraron un pH inicial de 4,21 y después de las 72 horas de fermentación aumentó a 4,63. Los autores Camu et al., (2007) mencionan que durante la fermentación existe una sucesión microbiana de levaduras, bacterias del ácido láctico (LAB) y bacterias del ácido acético (AAB), en la cual, las levaduras disuelven el mucílago a través de la despectinización que reduce la viscosidad del mismo y a su vez, producen etanol a partir de azúcares y ácido cítrico en condiciones anaeróbicas en un ambiente ácido (pH < 4,0) rico en carbohidratos. A medida que se drena el mucílago, continúa la

formación de etanol y aumentan tanto la temperatura como el pH, lo que crea las condiciones ideales para el crecimiento de BAL. Por otro lado, Camu et al., (2007) señalan que el citrato y los azúcares se convierten en ácido acético, ácido láctico y manitol, lo que permite un ligero aumento del pH del mucílago.

Con respecto al contenido de sólidos solubles, se obtuvo un valor inicial de 17,42 °Brix y disminuyó durante la fermentación del mucílago a 15,62 °Brix, al igual que el estudio realizado por Dulce et al., (2021) teniendo como valor inicial un contenido de sólidos solubles de 14,9 °Brix reduciéndose a 8,5 °Brix durante las 72 horas de fermentación. Los autores Afoakwa et al., (2012) señalan que la disminución del contenido de sólidos solubles durante los primeros tres días de fermentación se debe a la degradación de azúcares en la pulpa por levaduras y bacterias ácido lácticas. Las levaduras y las bacterias del ácido láctico metabolizan los azúcares fermentables en mucílago de cacao durante la fermentación para producir etanol y ácido láctico respectivamente.

Así mismo, se identificó en la acidez titulable un valor de 0,86% en el mucílago fresco de cacao, mostrando una disminución de 0,61% en el periodo de fermentación, estos resultados presentaron una estrecha relación con el estudio realizado por Otárola, (2018) obteniendo un valor de acidez titulable inicial de 1,28% reduciéndose a 0,58% durante la fermentación. El autor Apriyanto, (2017) menciona que los niveles de acidez disminuyen después de 3 días de fermentación, debido a que la mayor parte del ácido producido es difundido en el mucílago, nuevamente, a medida que se reduce el volumen del mismo hay una mejora en la aireación de la fermentación de la biomasa (mucílago) que conduce a la evaporación de ácidos volátiles como el ácido acético, el cual, es considerado como uno de los principales indicadores de acidez.

Respecto a la interacción A*B (Variedades * Estado del mucílago)

El mucílago es el sustrato metabolizado durante la fermentación por una secuencia de bacterias y hongos y dado que las propiedades del sustrato determinan el desarrollo microbiano y el metabolismo, los cambios en el mucílago pueden afectar la producción de ácidos por bacterias ácido lácticas, levaduras y bacterias del ácido acético (Ohene Afoakwa et al., 2011).

En base al pH de la interacción CCN-51 + mucílago fermentado y Forastero + mucílago fermentado presentaron los valores más altos de 4,19 y 4,23 respectivamente, mientras que, la interacción Trinitario + mucílago fresco presentó un pH más bajo de 3,41. Los autores Carolina Sanchez Capa et al., (2019) afirman que el pH del mucílago está sujeto a cambios genéticos, la variabilidad y los métodos de fermentación, lo que explica la diferencia significativa que existió entre las fermentaciones. Por otro lado, el estudio de Afoakwa et al., (2012) señala que el mucílago fresco de cacao ha sido reportado en un rango entre (3,3 – 4) debido a una alta concentración de ácido cítrico; el pH del mucílago fermentado incrementó a 4,02, provocando un aumento gradual del pH durante la fermentación, esto se debe a la avería de los azúcares del mucílago, por lo tanto reduce el volumen del mismo, conduciendo a la disminución de la concentración de ácidos cítricos, por lo cual el pH aumenta después de la fermentación.

En relación a los sólidos solubles, la interacción de la variedad Trinitario + mucílago fresco obtuvo un mayor contenido de sólidos solubles de 19,20, mientras que, la variedad Forastero + mucílago fermentado mostró un valor más bajo de 14,60. El contenido inicial de sólidos solubles del mucílago fresco, es más alto en comparación al fermentado, ya que la muestra fresca es rica en azúcares, los cuales se consumirán por microorganismos fermentadores (Putri Rahayu et al., 2019). Los autores Bariah & Y, (2017) mencionan que durante la fermentación los sólidos solubles muestran una tendencia decreciente por el consumo de azúcares por parte de las levaduras. Durante la fermentación, las condiciones anaeróbicas permiten el desarrollo de las bacterias del ácido láctico (BAL) que ayuda en la descomposición del azúcar y produce ácido láctico, ácido acético y manitol (Prabhakaran Nair, 2010), consumiendo ácido cítrico.

La acidez titulable del mucílago del cacao correspondieron inversamente a la tendencia del pH, identificándose un valor más alto de 1,11% en la variedad Trinitario + mucílago fresco y un valor más bajo de acidez de 0,48% en la variedad Forastero + mucílago fermentado; los resultados obtenidos en este estudio son concordantes con los de Ortiz de Bertorelli et al., (2009) quienes han observado que la baja acidez se debe a la disminución de la formación de los ácidos acético y láctico en el mucílago y su absorción durante la fermentación.

Se ha admitido que la acidez inicial del mucílago (pH 3,6) junto con el alto contenido de azúcar y la limitada disponibilidad de oxígeno favorecen la colonización por

levaduras, mientras que, las condiciones modificadas favorecen el desarrollo de bacterias ácido lácticas (Kouamé et al., 2015).

Actividad antimicrobiana

Variedades de mucílago de cacao (Factor A)

Se evidenció una mayor inhibición en la solución libre de células (SLC) obtenida de las BAL (*Lactobacillus plantarum*) en la variedad Forastero, registrando un diámetro de inhibición de 10,08 mm, seguido por la variedad Trinitario con un diámetro de 8,83 mm y CCN-51 de 8,16 mm a partir de la SLC de *Lactobacillus fermentum* como bacteria predominante de las mismas. Los resultados de este estudio presentaron similitud con la investigación realizada por Cervantes, (2020) en el cual la SLC de *Lactobacillus plantarum* presentó un mayor efecto inhibitorio debido a su capacidad de producción de ácidos orgánicos (ácido láctico, acético, succínico y 3-fenil-láctico), mientras que, *Lactobacillus fermentum* produce compuestos orgánicos volátiles (ácido bencenoacético y 2-propenil-ester) o ácidos grasos hidroxilados (ácido 2-hidroxi-4-metilpentanoico y lactonas).

Microorganismos patógenos (Factor B)

Se obtuvo un mayor diámetro de inhibición en el microorganismo *Aspergillus niger* con un valor de 10,05 mm, mientras que, en *Moniliophthora roreri* se registró una menor inhibición de 8,00 mm. Estos microorganismos patógenos que se ven afectados por la solución antimicrobiana, ya que provoca la pérdida o inactivación de sus mecanismos de defensa (De la Fuente et al., 2015). Por otro lado, los autores Vahedi-Shahandashti & Lass-Flörl, (2020) mencionan que los microorganismos fúngicos pueden ser atacados en la célula, tanto en la pared celular como en la membrana celular y también objetivos intracelulares como las mitocondrias y procesos como el metabolismo y respuestas al estrés. En el estudio realizado por Shishodia et al., (2019) señalan que en el caso de *Aspergillus niger*, la SLC provoca un daño en la membrana celular fúngica y produce un estrés oxidativo, mostrando una mayor sensibilidad en la vía metabólica. Por otro lado, los autores Teixeira et al., (2014) identificaron que *Moniliophthora roreri* tiene un gran potencial para la desintoxicación celular y la tolerancia al estrés, lo cual indica que el hongo podría lidiar con la toxicidad del estrés oxidativo en la inhibición.

Respecto a la interacción A*B (Variedades * Microorganismo Patógeno)

Los resultados del estudio mostraron una inhibición en todos los tratamientos, sin embargo, se observó un mayor diámetro de inhibición en la SLC (*Lactobacillus plantarum*) de la variedad Forastero + *Aspergillus niger* con un valor de 11,00 mm y una menor inhibición en la SLC (*Lactobacillus fermentum*) de 7,16 mm obtenida de la variedad CCN-51 + *Moniliophthora roreri*. El autor Correa Franco, (2018) señala que la SLC tiene el potencial de reducir el porcentaje de germinación de los conidios de los microorganismos patógenos confiriéndole una capacidad inhibitoria. El estudio de Vásquez M. et al., (2009) indica que la SLC obtenida de *Lactobacillus plantarum* tiene mayor efecto inhibitorio, dado que la actividad antimicrobiana de los ácidos orgánicos se ve influenciada por su fracción no disociada y, por su naturaleza lipofílica, puede atravesar la membrana celular, disociándose en el citoplasma del microorganismo patógeno. En el caso de la SLC obtenida de *Lactobacillus fermentum*, Cervantes, (2020) menciona que presentó menor inhibición, la cual pudo deberse a una producción más baja de ácidos orgánicos, la cual está relacionada con la producción de otros compuestos que tendrán influencia en el efecto de la actividad antimicrobiana; así mismo, identificaron que la SLC obtenida a partir de *Lactobacillus plantarum* presentó un mayor porcentaje de inhibición de 89%, mientras que, para el caso de *Lactobacillus fermentum* existió una menor inhibición de 87% frente a *Aspergillus niger*, presentando similitud con los datos obtenidos en este estudio.

Capítulo VI

Conclusiones

Factor A (*Variedades*)

La solución libre de células SLC de las tres variedades de cacao presentaron diferencias con respecto a la inhibición; la SLC variedad Forastero presentó un mayor diámetro de 10,08 mm, mientras que la variedad CCN-51 tuvo menor efecto inhibitorio registrando un valor de 8,16 mm.

Factor B (*Microorganismos patógenos*)

Los microorganismos patógenos (*Moniliophthora roreri* y *Aspergillus Niger*) presentaron diferencias con respecto a la inhibición, ya que *Moniliophthora roreri* fue más resistente con un diámetro menor de 8,00 mm en comparación con *Aspergillus niger*, que fue más susceptible con un valor de 10,05 mm.

Factor A*B (*Variedades*Microorganismos patógenos*)

El tratamiento que tuvo mayor efecto inhibitorio fue Forastero + *Aspergillus niger* con un diámetro de inhibición de 11,00 mm, mientras que, el tratamiento CCN-51 + *Moniliophthora roreri* presentó menor influencia en la inhibición con un diámetro de 7,16 mm.

Con la identificación molecular se determinó que las bacterias predominantes fueron *Lactobacillus plantarum* con influencia en la actividad antimicrobiana de la SLC de la variedad Forastero y *Lactobacillus fermentum* en la SLC de las variedades CCN-51 y Trinitario.

Con base a los resultados de los factores (variedades y microorganismos patógenos) se aceptan las hipótesis nulas y se rechazan las hipótesis alternativas, ya que las bacterias ácido lácticas con capacidad probiótica y los microorganismos patógenos de interés, sí influyen en la actividad antimicrobiana.

Recomendaciones

Se recomienda utilizar la variedad Forastero, ya que presentó los parámetros físico-químicos óptimos en el mucílago de cacao, siendo características importantes para el desarrollo de bacterias ácido lácticas.

Se recomienda realizar la fermentación por 72 horas, ya que en este periodo se establecieron las condiciones adecuadas para la obtención de *Lactobacillus plantarum* y *Lactobacillus fermentum* con potencial inhibitorio.

Se recomienda emplear el método de Kirby bauer para la inhibición de *Aspergillus niger* ya que presentó mayor susceptibilidad en los diferentes tratamientos.

Capítulo VII

Bibliografía

- Afoakwa, E. O., Kongor, J. E., Takrama, J. F., & Budu, A. S. (2012). Changes in acidification, sugars and mineral composition of cocoa pulp during fermentation of pulp pre-conditioned cocoa (*Theobroma cacao*) beans. *International Food Research Journal* 2, 03. https://www.worldcocoafoundation.org/wp-content/uploads/files_mf/1383600978Afoakwa2013PostHarvestFermentation.pdf
- Álvarez, J. C., Martínez, S. C., & Coy, J. (2014). Estado de la moniliasis del cacao causada por *Moniliophthora roreri* en Colombia. *Acta Agronómica*, 63(4), 388–399. <https://doi.org/10.15446/ACAG.V63N4.42747>
- Apriyanto, M. (2017). Analysis of Amino Acids in Cocoa Beans Produced during Fermentation by High Performance Liquid Chromatography (HPLC). *International Journal of Food and Fermentation Technology*, 7(1), 25. <https://doi.org/10.5958/2277-9396.2017.00003.4>
- Bailey, B. A., Evans, H. C., Phillips-Mora, W., Ali, S. S., & Meinhardt, L. W. (2018a). *Moniliophthora roreri*, causal agent of cacao frosty pod rot. *Molecular Plant Pathology*, 19(7), 1580. <https://doi.org/10.1111/MPP.12648>
- Bailey, B. A., Evans, H. C., Phillips-Mora, W., Ali, S. S., & Meinhardt, L. W. (2018b). *Moniliophthora roreri*, causal agent of cacao frosty pod rot. *Molecular Plant Pathology*, 19(7), 1580. <https://doi.org/10.1111/MPP.12648>
- Bariah, K., & Y, T. A. (2017). Effect of Cocoa Pods Storage on the Temperature and Physicochemical Changes during Shallow Box Fermentation. *IJSET-International Journal of Innovative Science, Engineering & Technology*, 4(12), 1–7. www.ijiset.com
- Bhattacharjee, R., & Akoroda, M. (2018). Taxonomy and classification of cacao. *ResearchGate*, 3–18. <https://doi.org/10.19103/AS.2017.0021.01>
- Biswas Majee, S., Avlani, D., & Roy Biswas, G. (2017). Rheological Behavior and Pharmaceutical Applications of Bacterial Exopolysaccharides. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, 7(09), 224–232. <https://doi.org/10.7324/JAPS.2017.70931>
- Bjö, J., & Koort, J. (2016). Lactic Acid Bacteria: Taxonomy and Biodiversity. *Food*

Science. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-100596-5.00864-7>

- Blare, T., & Useche, P. (2014). What Does it Mean to be Socially Responsible? Case Study on the Impact of the Producer-Plus-Program on Communities, Women, and the Environment in Ecuador. *Feed the Future*.
- Boza, E. J., Motamayor, J. C., Amores, F. M., Cedeño-Amador, S., Tondo, C. L., Livingstone, D. S., Schnell, R. J., & Gutiérrez, O. A. (2014a). Genetic Characterization of the Cacao Cultivar CCN 51: Its Impact and Significance on Global Cacao Improvement and Production. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, *139*(2), 219–229. <https://doi.org/10.21273/JASHS.139.2.219>
- Boza, E. J., Motamayor, J. C., Amores, F. M., Cedeño-Amador, S., Tondo, C. L., Livingstone, D. S., Schnell, R. J., & Gutiérrez, O. A. (2014b). Genetic Characterization of the Cacao Cultivar CCN 51: Its Impact and Significance on Global Cacao Improvement and Production. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, *139*(2), 219–229. <https://doi.org/10.21273/JASHS.139.2.219>
- Camu, N., De Winter, T., Verbrugge, K., Cleenwerck, I., Vandamme, P., Takrama, J. S., Vancanneyt, M., & De Vuyst, L. (2007). Dynamics and Biodiversity of Populations of Lactic Acid Bacteria and Acetic Acid Bacteria Involved in Spontaneous Heap Fermentation of Cocoa Beans in Ghana. *Applied and Environmental Microbiology*, *73*(6), 1809. <https://doi.org/10.1128/AEM.02189-06>
- Carolina Sanchez Capa, M., Mestanza Ramon, C., Beatriz Vargas Tierras, Y., Armando Burbano Cachiguango, R., Santiago Calero Cardenas, A., & Andres Ramirez Romero, C. (2019). Evaluation of the Cocoa Bean (*Theobroma Cacao* L.), using Two Fermentators, Orellana and Sucumbios Provinces, Ecuador. *International Journal of Engineering Research & Technology*, *08*(7), 1–7. www.ijert.org
- Cerri, M., Reale, L., & Zadra, C. (2019). Metabolite Storage in *Theobroma cacao* L. Seed: Cyto-Histological and Phytochemical Analyses. *Frontiers in Plant Science*, *10*, 1599. <https://doi.org/10.3389/FPLS.2019.01599/BIBTEX>
- Cervantes, A. (2020). *AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DE BACTERIAS ÁCIDO-LÁCTICAS AISLADAS DEL CACAO CON CAPACIDAD ANTIFÚNGICA*. Instituto Tecnológico de Veracruz.
- Cizeikiene, D., Juodeikiene, G., Paskevicius, A., & Bartkiene, E. (2013). Antimicrobial

- activity of lactic acid bacteria against pathogenic and spoilage microorganism isolated from food and their control in wheat bread. *ScienceDirect*, 31(2), 539–545. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2012.12.004>
- Copetti, M. V., Iamanaka, B. T., Frisvad, J. C., Pereira, J. L., & Taniwaki, M. H. (2011). Mycobiota of cocoa: From farm to chocolate. *Food Microbiology*, 28(8), 1499–1504. <https://doi.org/10.1016/J.FM.2011.08.005>
- Correa Franco, M. (2018). *Desarrollo de una mezcla microbiana para la inclusión como probiótico en la industria avícola: estudio de su acción sobre hongos contaminantes y micotoxinas* [Universidad Nacional de La Plata]. <https://doi.org/10.35537/10915/66124>
- Coulibaly, S. K., & Erbao, C. (2019). An empirical analysis of the determinants of cocoa production in Cote d'Ivoire. *Journal of Economic Structures*, 8(1), 1–19. <https://doi.org/10.1186/S40008-019-0135-5/TABLES/7>
- De la Fuente, N., Villareal, J., Díaz, M., & García, A. (2015). *Evaluación de la actividad de los agentes antimicrobianos ante el desafío de la resistencia bacteriana*. *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas*. http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1870-01952015000200007
- De Vuyst, L., & Weckx, S. (2016). The cocoa bean fermentation process: from ecosystem analysis to starter culture development. *Journal of Applied Microbiology*, 121(1), 5–17. <https://doi.org/10.1111/JAM.13045>
- Díaz-Valderrama, J. R., Leiva-Espinoza, S. T., & Catherine Aime, M. (2020). The history of cacao and its diseases in the Americas. *Phytopathology*, 110(10), 1604–1619. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-05-20-0178-RVW/ASSET/IMAGES/LARGE/PHYTO-05-20-0178-RVWT2.JPEG>
- Diep, D., & Nes, I. (2002). Ribosomally synthesized antibacterial peptides in Gram positive bacteria. *Current Drug Targets*, 3(2), 107–122. <https://doi.org/10.2174/1389450024605409>
- Dini, I. (2019). An overview of functional beverages. *Functional and Medicinal Beverages: Volume 11: The Science of Beverages*, 1–40. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-816397-9.00001-7>

- Dulce, V. R., Anne, G., Manuel, K., Carlos, A. A., Jacobo, R. C., Sergio de Jesús, C. E., & Eugenia, L. C. (2021). Cocoa bean turning as a method for redirecting the aroma compound profile in artisanal cocoa fermentation. *Heliyon*, 7(8), e07694. <https://doi.org/10.1016/J.HELIYON.2021.E07694>
- Epa, U., & of Pollution Prevention, O. (1997). *Aspergillus niger*.
- Evans, H. C., Holmes, K. A., & Reid, A. P. (2003). Phylogeny of the frosty pod rot pathogen of cocoa. *Plant Pathology*, 52(4), 476–485. <https://doi.org/10.1046/J.1365-3059.2003.00867.X>
- Fijan, S. (2014). Microorganisms with Claimed Probiotic Properties: An Overview of Recent Literature. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 11(5), 4745. <https://doi.org/10.3390/IJERPH110504745>
- Graziani de Fariñas, L., Ortiz de Bertorelli, L., & Parra, P. (2003). Características químicas de la semilla de diferentes tipos de cacao de la localidad de cumboto, aragua. *Agronomía Tropical*, 53(2), 133–144. http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0002-192X2003000200002&lng=es&nrm=iso&tlng=es
- Guzmán-Alvarez, R. E., & Márquez-Ramos, J. G. (2021). Fermentation of Cocoa Beans. *Fermentation - Processes, Benefits and Risks*. <https://doi.org/10.5772/INTECHOPEN.98756>
- Haase, T. B., Schweiggert-Weisz, U., Ortner, E., Zorn, H., & Naumann, S. (2021). Aroma Properties of Cocoa Fruit Pulp from Different Origins. *Molecules*, 26(24), 7618. <https://doi.org/10.3390/MOLECULES26247618>
- Han, X., Yang, Z., Jing, X., Yu, P., Zhang, Y., Yi, H., & Zhang, L. (2016). Improvement of the Texture of Yogurt by Use of Exopolysaccharide Producing Lactic Acid Bacteria. *BioMed Research International*, 2016, 6. <https://doi.org/10.1155/2016/7945675>
- Hermann A. Jürgen Pohlan, V. D. P. (2010, December 4). *GROWTH AND PRODUCTION OF CACAO*. ResearchGate. https://www.researchgate.net/publication/277952924_Hermann_A_Jurgen_Pohlan_Valentin_Diaz_Perez_2010_GROWTH_AND_PRODUCTION_OF_CACAO_in_Soils_Plant_Growth_and_Crop_Production_Ed_Willy_H_Verheye_in_Encyclopedia_of_Life_Support_Systems_EOLSS_Developed_and

- Hocking, A. D. (2006). *Aspergillus* and related teleomorphs. *Food Spoilage Microorganisms*, 451–487. <https://doi.org/10.1533/9781845691417.4.451>
- Inés, G., Quintero, P., Javier, J., Mejía, M., Gabriel, J., & Osorio Betancur, A. (2012). MICROBIOLOGÍA DE LA FERMENTACIÓN DEL MUCÍLAGO DE CAFÉ SEGÚN SU MADUREZ Y SELECCIÓN. *Cenicafé*, 63(2), 58–78.
- Jimenez, J. C., Amores, F. M., Solórzano, E. G., Rodríguez, G. A., Mantia, A. La, Blasi, P., & Loor, R. G. (2017). Differentiation of Ecuadorian National and CCN-51 cocoa beans and their mixtures by computer vision: *J Sci Food Agric*, 98(7), 2824–2829. <https://doi.org/10.1002/jsfa.8790>
- Kechagia, M., Basoulis, D., Konstantopoulou, S., Dimitriadi, D., Gyftopoulou, K., Skarmoutsou, N., & Fakiri, E. M. (2013). Health Benefits of Probiotics: A Review. *ISRN Nutrition*, 2013, 1–7. <https://doi.org/10.5402/2013/481651>
- Khalili, M., Rad, A. H., Khosroushahi, A. Y., Khosravi, H., & Jafarzadeh, S. (2020). Application of Probiotics in Folate Bio-Fortification of Yoghurt. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, 12(2), 756–763. <https://doi.org/10.1007/S12602-019-09560-7>
- Kouamé, L. M., Koua, G. A. Y., Niamké, J. A., Goualié, B. G., & Niamké, S. L. (2015). Cocoa Fermentation from Agnéby-Tiassa: Biochemical Study of Microflora. <http://www.sciencepublishinggroup.com>, 3(6), 203. <https://doi.org/10.11648/J.AJBIO.20150306.12>
- Kumariya, R., Garsa, A. K., Rajput, Y. S., Sood, S. K., Akhtar, N., & Patel, S. (2019). Bacteriocins: Classification, synthesis, mechanism of action and resistance development in food spoilage causing bacteria. *Microbial Pathogenesis*, 128, 171–177. <https://doi.org/10.1016/J.MICPATH.2019.01.002>
- Li, M., Wang, Y., Cui, H., Li, Y., Sun, Y., & Qiu, H. J. (2020). Characterization of Lactic Acid Bacteria Isolated From the Gastrointestinal Tract of a Wild Boar as Potential Probiotics. *Frontiers in Veterinary Science*, 7, 49. <https://doi.org/10.3389/FVETS.2020.00049/BIBTEX>
- Marina Ureta Santana, D., & María Santos Roldán Beatriz Palacios Florencio, L. (2021). FACTORES QUE FAVORECEN LA EXPORTACIÓN DE GRANOS DE CACAO DEL ECUADOR. *Interciencia*, 46(6), 272–279.

- Micheli, F., Gultinan, M., Gramacho, K. P., Wilkinson, M. J., Figueira, A. V. de O., Cascardo, J. C. de M., Maximova, S., & Lanaud, C. (2010). Functional Genomics of Cacao. *Advances in Botanical Research*, 55(C), 119–177.
<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-380868-4.00003-X>
- Mokobi, F. (2021, April 29). *Aspergillus niger- An Overview - Mycology - Microbe Notes*.
<https://microbenotes.com/aspergillus-niger/>
- Mokoena, M. P. (2017). Lactic Acid Bacteria and Their Bacteriocins: Classification, Biosynthesis and Applications against Uropathogens: A Mini-Review. *Molecules : A Journal of Synthetic Chemistry and Natural Product Chemistry*, 22(8).
<https://doi.org/10.3390/MOLECULES22081255>
- Moreno-Escamilla, J. O., Alvarez-Parrilla, E., De La Rosa, L. A., Núñez-Gastélum, J. A., González-Aguilar, G. A., & Rodrigo-García, J. (2018). Preharvest Modulation of Postharvest Fruit and Vegetable Quality Effect of Elicitors in the Nutritional and Sensorial Quality of Fruits and Vegetables. *Preharvest Modulation of Postharvest Fruit and Vegetable Quality*, 0. <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-809807-3.00003-2>
- Nunes, C. S. O., Da Silva, M. L. C., Camilloto, G. P., Machado, B. A. S., Hodel, K. V. S., Koblitz, M. G. B., Carvalho, G. B. M., & Uetanabaro, A. P. T. (2020). Potential Applicability of Cocoa Pulp (*Theobroma cacao* L) as an Adjunct for Beer Production. *The Scientific World Journal*, 2020, 14.
<https://doi.org/10.1155/2020/3192585>
- Ohene Afoakwa, E., Quao, J., Takrama, J., Simpson Budu, A., & Kwesi Saalia, F. (2011). Chemical composition and physical quality characteristics of Ghanaian cocoa beans as affected by pulp pre-conditioning and fermentation. *Journal of Food Science and Technology*, 50(6), 1097–1105. <https://doi.org/10.1007/s13197-011-0446-5>
- Ortiz de Bertorelli, L., Graziani de Fariñas, L., & Gervaise, R. L. (2009). Evaluación de varios factores sobre características químicas del grano de cacao en fermentación. *Agronomía Tropical*, 59(1), 73–79.
http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0002-192X2009000100007&lng=es&nrm=iso&tlng=es

- Otárola, A. (2018). "EFECTO DE LA ENZIMA PECTOLÍTICA Y LEVADURA (*Saccharomyces cerevisiae*) EN LA FERMENTACIÓN Y CALIDAD DEL CACAO VAR. CRIOLLO (*Theobroma cacao*)" [Universidad Nacional Federico Villarreal]. http://repositorio.unfv.edu.pe/bitstream/handle/UNFV/2412/OTAROLA_GAMARRA_ANTONIO.pdf?sequence=1&isAllowed=y
- Papalexandratou, Z., & De Vuyst, L. (2011). Assessment of the yeast species composition of cocoa bean fermentations in different cocoa-producing regions using denaturing gradient gel electrophoresis. *FEMS Yeast Research*, 11(7), 564–574. <https://doi.org/10.1111/J.1567-1364.2011.00747.X>
- Peláez, P. P., Guerra, S., & Contreras, D. (2016). Changes in physical and chemical characteristics of fermented cocoa (*Theobroma cacao*) beans with manual and semi-mechanized transfer, between fermentation boxes. *Scientia Agropecuaria*, 7(2), 111–119. <https://doi.org/10.17268/SCI.AGROPECU.2016.02.04>
- Prabhakaran Nair, K. P. (2010). The agronomy and economy of important tree crops of the developing world. *Elsevier*, 351.
- Putri Rahayu, E., Bagus Nugroho, I., & Lisdiyanti, P. (2019). Lactic acid bacteria (LAB) isolated from fermented cocoa beans prevent the growth of model food-contaminating bacteria. *AIP Conference Proceedings*, 17. <https://doi.org/10.1063/1.5098410>
- Rojas, K. E., García, M. C., Cerón, I. X., Ortiz, R. E., & Tarazona, M. P. (2020). Identification of potential maturity indicators for harvesting cacao. *Heliyon*, 6(2). <https://doi.org/10.1016/J.HELIYON.2020.E03416>
- Rokas, A. (2013). *Aspergillus*. *Current Biology*, 23(5), R187–R188. <https://doi.org/10.1016/J.CUB.2013.01.021>
- Romero-Cortes, T., López-Pérez, P. A., Pérez España, V. H., Medina-Toledo, A. K., Aparicio-Burgos, J. E., & Cuervo-Parra, J. A. (2019). CONFRONTATION OF *Trichoderma asperellum* VSL80 AGAINST *Aspergillus niger* VIA THE EFFECT OF ENZYMIC PRODUCTION CONFRONTACIÓN DE *Trichoderma asperellum* VSL80 CONTRA *Aspergillus niger* A TRAVÉS DEL EFECTO DE LA PRODUCCIÓN ENZIMÁTICA. *Chilean J. Agric. Anim. Sci., Ex Agro-Ciencia*, 35(1), 68–80. <http://rsbweb.nih>.

- Ruiz Rodríguez, L. G., Mohamed, F., Bleckwedel, J., Medina, R., De Vuyst, L., Hebert, E. M., & Mozzi, F. (2019). Diversity and functional properties of lactic acid bacteria isolated from wild fruits and flowers present in northern Argentina. *Frontiers in Microbiology*, *10*, 1091. <https://doi.org/10.3389/FMICB.2019.01091/BIBTEX>
- Sánchez Olaya, D. M., Rodríguez Pérez, W., Castro Rojas, D. F., Trujillo Trujillo, E., Sánchez Olaya, D. M., Rodríguez Pérez, W., Castro Rojas, D. F., & Trujillo Trujillo, E. (2019). Respuesta agronómica de mucilago de cacao (*Theobroma cacao* L.) en cultivo de maíz (*Zea mays* L.). *Ciencia En Desarrollo*, *10*(2), 43–58. <https://doi.org/10.19053/01217488.V10.N2.2019.7958>
- Santana, P., Vera, J., Vallejo, C., & Alvarez, A. (2018). MUCÍLAGO DE CACAO, NACIONAL Y TRINITARIO PARA LA OBTENCIÓN DE UNA BEBIDA HIDRATANTE. *Universidad Ciencia y Tecnología*, *4*, 179–189. <https://www.uctunexpo.autanabooks.com/index.php/uct/article/view/24>
- Santander Muñoz, M., Rodríguez Cortina, J., Vaillant, F. E., & Escobar Parra, S. (2019). An overview of the physical and biochemical transformation of cocoa seeds to beans and to chocolate: Flavor formation. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, *60*(10), 1593–1613. <https://doi.org/10.1080/10408398.2019.1581726>
- SERVICIO ECUATORIANO DE NORMALIZACIÓN INEN. (1985a). *CONSERVAS VEGETALES. DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DEL IÓN HIDRÓGENO (PH) (NTE INEN 389)*. <http://apps.normalizacion.gob.ec/descarga/index.php/buscar>
- SERVICIO ECUATORIANO DE NORMALIZACIÓN INEN. (1985b). *CONSERVAS VEGETALES. DETERMINACION DE SÓLIDOS SOLUBLES. MÉTODO REFRACTOMÉTRICO (NTE INEN 30)*. <http://apps.normalizacion.gob.ec/descarga/>
- SERVICIO ECUATORIANO DE NORMALIZACIÓN INEN. (1985). *CONSERVAS VEGETALES. DETERMINACIÓN DE ACIDEZ TITULABLE. MÉTODO POTENCIOMÉTRICO DE REFERENCIA (NTE INEN 381)*. <http://apps.normalizacion.gob.ec/descarga/index.php/buscar>
- Shishodia, S. K., Tiwari, S., & Shankar, J. (2019). Resistance mechanism and proteins in *Aspergillus* species against antifungal agents. *Mycology*, *10*(3), 151. <https://doi.org/10.1080/21501203.2019.1574927>

- Šimonovičová, A., Vojtková, H., Nosalj, S., Piecková, E., Švehláková, H., Kraková, L., Drahovská, H., Stalmachová, B., Kučová, K., & Pangallo, D. (2021). *Aspergillus niger* Environmental Isolates and Their Specific Diversity Through Metabolite Profiling. *Frontiers in Microbiology*, 12. <https://doi.org/10.3389/FMICB.2021.658010/FULL>
- Sterling, C. A., Hermida-Daza, M. A., Rodríguez-León, C. H., Salas-Tobón, Y. M., Nieto-Guzmán, M. N., & Caicedo-Rodríguez, D. F. (2015). Reacción a *Moniliophthora roreri* en *Theobroma* spp. en Caquetá, Colombia. *Summa Phytopathologica*, 41(3), 183–190. <https://doi.org/10.1590/0100-5405/2026>
- Teixeira, P. J. P. L., De Toledo Thomazella, D. P., Reis, O., Prado, P. F. V. Do, Rio, M. C. S. Do, Fiorin, G. L., José, J., Costa, G. G. L., Negri, V. A., Mondego, J. M. C., Mieczkowski, P., & Pereira, G. A. G. (2014). High-Resolution Transcript Profiling of the Atypical Biotrophic Interaction between *Theobroma cacao* and the Fungal Pathogen *Moniliophthora perniciosa*. *The Plant Cell*, 26(11), 4245–4269. <https://doi.org/10.1105/TPC.114.130807>
- Tirado-Gallego, P. A., Lopera-Álvarez, A., & Ríos-Osorio, L. A. (2016). Estrategias de control de *Moniliophthora roreri* y *Moniliophthora perniciosa* en *Theobroma cacao* L.: revisión sistemática. *Ciencia y Tecnología Agropecuaria*, 17(3), 417–430. https://doi.org/10.21930/RCTA.VOL17_NUM3_ART:517
- Vahedi-Shahandashti, R., & Lass-Flörl, C. (2020). Novel Antifungal Agents and Their Activity against *Aspergillus* Species. *Journal of Fungi 2020*, Vol. 6, Page 213, 6(4), 213. <https://doi.org/10.3390/JOF6040213>
- Valderrama, J. (2020, August 20). *The History of Cacao and Its Diseases in the Americas*. *Pythopathology*. <https://apsjournals.apsnet.org/doi/pdf/10.1094/PHYTO-05-20-0178-RVW>
- Vallejo, Ch., Ocampo, R., Rodríguez, W., Velasco, R., Vera Chang, J., & Cedeño, C. (2016, April 25). *Utilización del mucílago de cacao, tipo nacional y trinitario, en la obtención de jalea*. REVISTA ESPA CIENCIA. http://190.15.136.171/index.php/Revista_ESPAMCIENCIA/article/view/116/99
- Vásquez M., S. M., Suárez M., H., & Zapata B., S. (2009). UTILIZACIÓN DE SUSTANCIAS ANTIMICROBIANAS PRODUCIDAS POR BACTERIAS ACIDO

LÁCTICAS EN LA CONSERVACIÓN DE LA CARNE. *Revista Chilena de Nutrición*, 36(1), 64–71. <https://doi.org/10.4067/S0717-75182009000100007>

Wang, Y., Wu, J., Lv, M., Shao, Z., Hungwe, M., Wang, J., Bai, X., Xie, J., Wang, Y., & Geng, W. (2021). Metabolism Characteristics of Lactic Acid Bacteria and the Expanding Applications in Food Industry. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 9. <https://doi.org/10.3389/FBIOE.2021.612285>

Wickramasuriya, A. M., & Dunwell, J. M. (2018). Cacao biotechnology: current status and future prospects. *Plant Biotechnology Journal*, 16(1), 4–17. <https://doi.org/10.1111/PBI.12848>

Yaw Berbiye, I. (2014). Raw Cocoa (*Theobroma cacao* L.) Quality Parameters-with special Reference to West Africa. *Faculty of Mathematics, Informatics and Natural Science*.

Yunes, R. A., Poluektova, E. U., Dyachkova, M. S., Klimina, K. M., Kovtun, A. S., Averina, O. V., Orlova, V. S., & Danilenko, V. N. (2016). GABA production and structure of *gadB/gadC* genes in *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* strains from human microbiota. *Anaerobe*, 42, 197–204. <https://doi.org/10.1016/J.ANAEROBE.2016.10.011>