UNIVERSIDAD TÉCNICA ESTATAL DE QUEVEDO

FACULTAD DE CIENCIAS PECUARIAS

CARRERA DE INGENIERÍA AGROPECUARIA

Proyecto de Investigación previo a la obtención del título de Ingeniera Agropecuaria.

Título del Proyecto de Investigación:

"ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD MICROBIANA DURANTE EL PROCESO DE FERMENTACIÓN EN HÌBRIDOS DE CACAO *(Theobroma cacao* L.*)* MEDIANTE LA ADICIÓN DE MUSÁCEAS"

Autora:

Gina Aidee Rivera Benites

Director del Proyecto de Investigación:

Ing. Jorge Gustavo Quintana Zamora, M.Sc.

Quevedo – Los Ríos – Ecuador

2017

DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y CESIÓN DE DERECHOS

Yo, Gina Aidee Rivera Benites, declaro que el trabajo aquí descrito es de mi autoría; que no ha sido previamente presentado para ningún grado o calificación profesional; y, que he consultado las referencias bibliográficas que se incluyen en este documento.

La Universidad Técnica Estatal de Quevedo, puede hacer uso de los derechos correspondientes a este trabajo, según lo establecido por la Ley de Propiedad Intelectual, por su reglamento y por la normatividad institucional vigente.

Gina Aidee Rivera Benites

AUTORA

CERTIFICACIÓN DE CULMINACIÓN DEL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN

El suscrito, Ing. Jorge Gustavo Quintana Zamora, M.Sc. Docente de la Universidad Técnica Estatal de Quevedo, certifica que la egresada **Gina Aidee Rivera Benites**, realizó el Proyecto de Investigación de grado titulado **"ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD MICROBIANA DURANTE EL PROCESO DE FERMENTACIÓN EN HÌBRIDOS DE CACAO *(Theobroma cacao* L.*)* MEDIANTE LA ADICIÓN DE MUSÁCEAS"** previo a la obtención del título de Ingeniera Agropecuaria**,** bajo mi dirección, habiendo cumplido con las disposiciones reglamentarias establecidas para el efecto.

.

_____

Ing. Jorge Gustavo Quintana Zamora, M.Sc.

DIRECTOR DE PROYECTO DE INVESTIGACIÓN

CERTIFICADO DEL REPORTE DE LA HERRAMIENTA DE PREVENCIÓN DE COINCIDENCIA Y/O PLAGIO ACADÉMICO

Dando cumplimiento al Reglamento de la Unidad de Titulación Especial de la Universidad Técnica Estatal de Quevedo y a las normativas y directrices establecidas por el SENESCYT, el suscrito Ing. M.Sc. Jorge Gustavo Quintana Zamora, en calidad de Director del Proyecto de Investigación de Grado **"ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD MICROBIANA DURANTE EL PROCESO DE FERMENTACIÓN EN HÌBRIDOS DE CACAO *(Theobroma cacao* L.*)* MEDIANTE LA ADICIÓN DE MUSÁCEAS"**, de autoría de la estudiante Gina Aidee Rivera Benites, certifica que el porcentaje de similitud reportado por el Sistema URKUND es de 3%, el mismo que es permitido por el mencionado software y los requerimientos académicos establecidos.

URKUND

Urkund Analysis Result

Analysed Document: "ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD MICROBIANA DURANTE EL PROCESO DE FERMENTACION EN HIBRIDOS DE CACAO (Theobroma cacao L.) MEDIANTE LA ADICION DE MUSACEAS" 5.docx (D28191852)
Submitted: 2017-05-15 03:05:00
Submitted By: jquintana@uteq.edu.ec
Significance: 3 %

Sources included in the report:

TESIS ACTV. MICROBIANA URKUND (2).docx (D26881136)
"ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD MICROBIANA DURANTE EL PROCESO DE FERMENTACIÓN EN HÍBRIDOS DE CACAO (Theobroma cacao L.) MEDIANTE LA ADICIÓN DE MUSÁCEAS".docx (D26680720)

Instances where selected sources appear:

_____

Ing. Jorge Gustavo Quintana Zamora, M.Sc.
DIRECTOR DE PROYECTO DE INVESTIGACIÓN

UNIVERSIDAD TÉCNICA ESTATAL DE QUEVEDO

FACULTAD DE CIENCIAS PECUARIAS

CARRERA DE INGENIERÍA AGROPECUARIA

PROYECTO DE INVESTIGACIÓN

Título:

"ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD MICROBIANA DURANTE EL PROCESO DE FERMENTACIÓN EN HÌBRIDOS DE CACAO *(Theobroma cacao* L.) MEDIANTE LA ADICIÓN DE MUSÁCEAS",

Presentado a la Comisión Académica como requisito previo a la obtención del título de Ingeniera Agropecuaria.

Aprobado por:

PRESIDENTE DEL TRIBUNAL
Ing. Jaime Vera Chang. M.Sc.

MIEMBRO DEL TRIBUNAL
Ing. Christian Vallejo Torres. M.Sc.

MIEMBRO DEL TRIBUNAL
Dr. Camilo Mestanza Uquillas

Quevedo – Los Ríos – Ecuador

2017

AGRADECIMIENTO

El acto de agradecer es uno de los reconocimientos más sinceros de la humanidad, es por esto que agradezco a aquellos seres que de una forma u otra contribuyeron a realizar con éxito esta obra.

Mis agradecimientos son:

A DIOS, como único creador y fundador de mis esperanzas.

Al Ing. Jorge Quintana, Director de Tesis e Ing. David Zapatier, Encargado del Laboratorio de Rumiología y Metabolismo Animal, por la disposición brindada durante el proyecto.

Al Ing. Jaime Vera e Ing. Bolívar Montenegro, por la contribución esencial de los materiales y reactivos utilizados en el ensayo.

Al Dr. Gregorio Vasconez Montufar, porque a más de brindarme su ayuda en este proceso, es un gran amigo de corazón.

A Christian Pérez, por ser mi compañero incondicional y promotor de mis sueños.

A mi gran familia por su apoyo invaluable ya que sin sus palabras y consejos no hubiera llegado alcanzar esto.

Muchas Gracias

DEDICATORIA

"Cuando una persona desea realmente algo, el Universo entero conspira para que pueda realizar su sueño. Basta con aprender a escuchar los dictados del corazón y a descifrar un lenguaje que está más allá de las palabras, el que muestra aquello que los ojos no pueden ver."

Paulo Coelho

Dedicada con mucho cariño y amor a mis papás, Jaime Rivera y Gina Benites como los principales mentores de mi vida, los que con esfuerzo y dedicación supieron forjarme y lograr en convertirme en la persona que soy ahora.

A mis queridos hermanos Jerry y Angie Rivera por estar alentándome en todos los momentos de esta etapa, en especial a mi Angie quien es mi compañera ideal de risas y sueños.

Y a mi Tía Mary, por sus valiosas palabras y consejos a lo largo del trayecto.

GINA AIDEE RIVERA BENITES

Maktub

RESUMEN

El objetivo de la presente investigación fue evaluar la actividad microbiana mediante la adición de dos musáceas como fuente de energía durante el proceso de fermentación de almendras en híbridos experimentales de cacao *(Theobroma cacao* L.*)*. La evaluación se realizó en el Laboratorio de Rumiología y Metabolismo Nutricional (RUMEN) de la Finca Experimental "La María" perteneciente a la Universidad Técnica Estatal de Quevedo provincia de Los Ríos, durante un periodo de campo de un mes (Enero) aproximadamente. Se empleó un diseño completamente al azar (DCA) con arreglo factorial 2x4, realizando la prueba de Tukey al 5% de probabilidad, se manejaron ocho tratamientos y cuatro repeticiones, teniendo como factor A las híbridos (DIRCYT-258, 259, 263 y 265), y como el Factor B las musáceas (Puré de banano y plátano), se manejaron 576 unidades experimentales por tiempo de fermentación de cacao (24, 48 y 72 horas), así mismo se empelo el 10% de masa de las musáceas para el proceso fermentativo y se utilizó la disolución decimal 10^{-3} para la siembra de los microorganismos evaluados (bacterias acido lácticas, acéticas y levaduras), los resultados mostraron interacción para levaduras durante las 48 horas de haber iniciado el proceso de fermentación con respecto a unidades formadoras de colonias UFC g^{-1}, mientras que para las bacterias acido lácticas y acéticas, no fue significativo durante el tiempo evaluado pues estas se mantuvieron a la par con la población microbiana, concluyendo que la adición de dos musáceas como fuente de energía durante el proceso de fermentación de almendras en híbridos experimentales de cacao no generó un aumento en el número de unidades formadora de colonias UFC g^{-1} durante el proceso de fermentación.

Palabras claves: Cacao, musáceas, fermentación, microorganismos, UFC g^{-1}

ABSTRACT

The objective of scientific research is the evaluation of microbial activity by adding two sources as energy source during the fermentation process of almonds in experimental cocoa (Theobroma cacao L.) hybrids. The evaluation was carried out in the Laboratory of Nutrition Rumiology and Metabolism (RUMEN) of the Experimental Farm "La María", belonging to Quevedo State Technical University of Los Ríos province, during a field period of approximately one month (January). (DCA) with a 2x4 factorial arrangement, performing the Tukey test at 5% probability, eight treatments and four replications were managed, with hybrids (DIRCYT-258, 259, 263 and 265) as the A factor, Y as Factor B The plants (Banana puree and banana), 576 experimental units were handled for the fermentation time of cocoa (24, 48 and 72 hours), as well as 10% mass of the musaceae for the fermentation process. 10^{-3} decimal solution for the sowing of the evaluated microorganisms (lactic acid bacteria, acetic acid and yeast), the results showed interaction to raise during the 48 hours of starting the fermentation process with respect to the colony forming units UFC g^{-1}, whereas for acidic and acetic bacteria, it was not significant during the time evaluated as these were kept in tandem with the microbial population, conclude that the addition of two ways as they were Of energy during the fermentation process of almonds in hybrid cocoa experiments did not generate an increase in the number of colony forming units UFC g^{-1} during the fermentation process.

Key words: Cocoa, musaceae, fermentation, microorganisms, UFC g^{-1}

TABLA DE CONTENIDO.

Capítulo **Página.**

PORTADA…… i

DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y CESIÓN DE DERECHOS……. ii

CERTIFICACIÓN DE CULMINACIÓN DEL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN iii

CERTIFICADO DEL REPORTE DE LA HERRAMIENTA DE PREVENCIÓN DE COINCIDENCIA Y/O PLAGIO ACADÉMICO……. iv

AGRADECIMIENTO……... v

DEDICATORIA……. vi

RESUMEN……. vii

ABSTRACT…….. viii

TABLA DE CONTENIDO…… ix

ABREVIATURAS……. x

ÍNDICE DE TABLAS……... xi

ÍNDICE DE FIGURAS……. xii

ÍNDICE DE ECUACIONES……. xiii

ÍNDICE DE ANEXOS……... xiv

CÓDIGO DUBLIN …….. xv

INTRODUCCIÓN……..… 1

CAPÍTULO I: CONTEXTUALIZACIÓN DE LA INVESTIGACIÓN……... 3

1.1. Problema de investigación……. 4

1.1.1. Planteamiento del problema……. 4

1.1.2. Formulación del problema……. 5

1.1.3. Sistematización del problema…….. 5

1.2. Objetivos……. 6

1.2.1. Objetivo general……. 6

1.2.2. Objetivos específicos……. 6

1.3. Justificación……..……. 7

CAPÍTULO II: FUNDAMENTACIÓN TEÓRICA DE LA INVESTIGACIÓN.... 8
2.1. Marco conceptual…….…….. 9
2.2. Marco referencial…..……. 11
2.2.1. Origen…….....…….……. 11
2.3. El cacao (*Theobroma cacao* L.*)*…….……... 12
2.3.1. Cultivo de cacao en el Ecuador……..…….…….. 12
2.3.2. Tipos de cacao…….…….. 13
2.3.2.1. Cacao Criollo……..…….…….. 13
2.3.2.2. Cacao Forastero…..……. 13
2.3.2.3. Cacao Trinitario……. 13
2.3.2.4. Nacional…….. 14
2.3.3. Caracteristicas del fruto……..…… 14
2.3.4. Caracteristicas de la semilla…… 15
2.3.5. Beneficiado…….…… 16
2.3.6. Fermentaciòn……. ……. 16
2.3.6.1. Accion de los microorganismos en la fermentaciòn…….. 17
2.3.6.2. Primera fase……. 18
2.3.6.3. Segunda fase……. ….. 19
2.3.6.4. Tercera fase……. 19
2.3.6.5. Cuarta fase…….…. 19
2.3.7. Bacterias àcidas làcticas (BAL)…… 20
2.3.8. Bacterias acèticas acèticas (BAA)…….. 20
2.3.9. Mohos…….…….. 21
2.3.10. Levaduras…….……. 21
2.3.11. Invstigaciones relacionadas a la investigación……..…… 22

CAPÍTULO III: METODOLOGÍA DE LA INVESTIGACIÓN…….…… 25
3.1. Localización…….. 26
3.2. Tipo de investigación……. 26
3.3. Métodos de investigación…….. 27
3.4. Fuentes de recopilación de información…….. 27

3.5.	Diseño de la investigación…….	28
3.6.	Instrumentos de investigación……..	29
3.6.1.	Variables evaluadas……..	29
3.6.1.1.	pH…….……..	29
3.6.1.2.	Temperatura……..	30
3.6.1.3.	Grados Brix…….……..	30
3.6.1.4.	Acidez titulable..…….	30
3.6.1.5.	Conteo de microorganismos…….....	31
3.6.1.6.	Porcentaje de fermentaciòn……..	31
3.7.	Procedimiento experimental……..	31
3.7.1.	Manejo del campo…..…….……..…	31
3.7.1.1.	Cosecha…….…….	31
3.7.1.2.	Adiciòn de las musaceas…….……..	31
3.7.1.3.	Fermentaciòn…….…….	32
3.7.1.4.	Secado…….……	32
3.7.2.	Manejo de laboratorio…….…….	32
3.7.2.1.	Preparaciòn de medios de cultivo MRS……	32
3.7.2.2.	Preparaciòn de medios de cultivo Sabouraud agar..…….	33
3.7.2.3.	Preparaciòn de la peptona como diluyente…….	33
3.7.2.4.	Recoleccion de muestras de microorganismos…….	33
3.7.2.5.	Incubaciòn de los microorganismos…….	34
3.8.	Tratamiento de los datos……..	34
3.9.	Recursos humanos…….……	34
3.10.	Materiales……..	34
3.10.1.	Material genètico…….……..	35
3.10.2.	Musàceas…….……..	35
3.10.3.	Equipos……..…….	35
3.10.4.	Materiales de vidrio…….……..	35
3.10.5.	Otros materiales……..……	36
3.10.6.	Reactivos…….……..	37

CAPÍTULO IV: RESULTADOS Y DISCUSIÓN……..…… 38
4.1. Resultados y discusión…..…….. 39
4.1.1. Conteo microbiano…… 39
4.1.1.1. Levaduras…… 39
4.1.1.2. Bacterias acido lácticas……. 42
4.1.1.3. Bacterias acido acéticas……. 45
4.1.2. Análisis físicos- químicos de la fermentación……. 48
4.1.2.1. pH……... 48
4.1.2.2. Temperatura…… 51
4.1.2.3. Acidez titulable…….. 54
4.1.2.4. Grados Brix……. 57
4.1.2.5. Correlación brix- levaduras…… 60
4.1.2.6. Correlación brix- acidez titulable…….. 61
4.1.2.7. Prueba de corte…….. 61

CAPÍTULO V: CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES……...…… 64
5.1. Conclusiones……..…….…… 65
5.2. Recomendaciones…..……. 65

CAPÍTULO VI: BIBLIOGRAFÌA..... 66
6.1. Literatura citada…… 67

CAPÍTULO VII: ANEXOS..... 77
7.1. Cuadrados medios de las variables……... 78

ABREVIATURAS

Ac:	Ácido
BAL:	Bacterias ácido lácticas
BAA:	Bacterias acéticas
ML:	Mohos y Levaduras
cm:	Centímetro
cm^3:	Centímetro cúbico
mL:	Mililitros
mm:	Milímetro
g:	Gramos.
h:	Hora
L:	Litro
lb:	Libra
Min:	Minutos
mg:	Miligramos
µm:	Micro moles
µl:	Microlitro
UFC:	Unidades formadoras de colonias
T:	Temperatura
ºBx:	Grados Brix
pH:	Potencial de hidrogeno
Ha:	Hectárea
ºC:	Grados centígrados
MRS:	Man Rogosa y Sharpe
DCA:	Diseño completamente al azar
ANDEVA:	Análisis de varianza

ÍNDICE DE TABLAS.

Tabla		Página.
1.	Taxonomía del Cacao……	12
2.	Composiciòn quìmica de la cascara de la mazorca de cacao…….	16
3.	Composición química de la semilla de cacao……	17
4.	Características agrometeorológicas de la Finca Experimental “La María” UTEQ – Mocache…….	27
5.	Análisis de Varianza ANDEVA del diseño experimental……	29
6.	Descripción de los tratamientos……	30
7.	Características de medios de cultivos de los microorganismos...	34
8	Efecto de las musáceas durante el proceso de fermentación en híbridos de cacao (*Theobroma cacao* L.) sobre levaduras…….	40
9	Efecto de los híbridos durante el proceso de fermentación en cacao (*Theobroma cacao* L.) sobre levaduras……	41
10	Conteo de microorganismos (UFC g^{-1}) del proceso de fermentación en híbridos de cacao (*Theobroma cacao* L.) mediante la adición de musáceas sobre levaduras……..	44
11	Efecto de las musáceas durante el proceso de fermentación en híbridos de cacao (*Theobroma cacao* L.) sobre bacterias ácido lácticas……...	45
12	Efecto de los híbridos durante el proceso de fermentación en cacao (*Theobroma cacao* L.) sobre bacterias ácido lácticas……...	46
13	Conteo de bacterias ácidos lácticas (UFC g^{-1}) del proceso de fermentación en híbridos de cacao (*Theobroma cacao* L.)	

mediante la adición de musáceas……. 49

14 Efecto de las musáceas durante el proceso de fermentación en híbridos de cacao (*Theobroma cacao* L.) bacterias ácido acéticas…….. 50

15 Efecto de los híbridos durante el proceso de fermentación en cacao (*Theobroma cacao* L.) sobre bacterias ácido acéticas……... 51

16 Conteo de bacterias ácidos acéticas (UFC g^{-1}) del proceso de fermentación en híbridos de cacao (*Theobroma cacao* L.) mediante la adición de musáceas…….. 54

17 Efecto de las musáceas durante el proceso de fermentación en híbridos de cacao (*Theobroma cacao* L.) sobre el pH…… 55

18 Efecto de los híbridos durante el proceso de fermentación en cacao (*Theobroma cacao* L.) sobre pH. 57

19 Composición físico - química del proceso de fermentación (24, 48 y 72 horas) en híbridos de cacao (*Theobroma cacao* L.) mediante la adición de musáceas…….. 59

20 Efecto de las musáceas durante el proceso de fermentación en híbridos de cacao (*Theobroma cacao* L.) sobre temperatura…. 60

21 Efecto de los híbridos durante el proceso de fermentación en cacao (*Theobroma cacao* L.) sobre temperatura…….. 61

22 Composición físico - química del proceso de fermentación (24, 48 y 72 horas) en híbridos de cacao (*Theobroma cacao* L.) mediante la adición de musáceas…….. 63

23 Efecto de las musáceas durante el proceso de fermentación en híbridos de cacao (*Theobroma cacao* L.) sobre la acidez

titulable……... 64

24 Efecto de los híbridos durante el proceso de fermentación en cacao (*Theobroma cacao* L.) sobre acidez titulable…….. 65

25 Composición físico - química del proceso de fermentación (24, 48 y 72 horas) en híbridos de cacao (*Theobroma cacao* L.) mediante la adición de musáceas…….. 68

26 Efecto de las musáceas durante el proceso de fermentación en híbridos de cacao (*Theobroma cacao* L.) sobre los grados Brix. 69

27 Efecto de los híbridos durante el proceso de fermentación en cacao (*Theobroma cacao* L.) sobre grados Brix……. 70

28 Composición físico - química del proceso de fermentación (24, 48 y 72 horas) en híbridos de cacao (*Theobroma cacao* L.) mediante la adición de musáceas…….. 72

29 Composición físico - química del proceso de fermentación (24, 48 y 72 horas) en híbridos de cacao (Theobroma cacao L.) mediante la adición de musáceas sobre grados de fermentación 74

ÍNDICE DE ECUACIONES.

Ecuación		Página.
1.	Modelo estadístico del diseño experimental…….	28
2.	Cálculo de acidez titulable……	30

ÍNDICE DE ANEXOS.

Anexo		Página.
1.	Cuadrado medio de levaduras……	91
2.	Cuadrado medio de bacterias acido lácticas…….	91
3.	Cuadrado medio de bacterias acido acéticas…….	92
4.	Cuadrado medio de pH…….	92
5.	Cuadrado medio de temperatura…….	93
6.	Cuadrado medio de acidez titulable……	93
7.	Cuadrado medio de Grados Brix…….	94
8.	Cuadrado medio de porcentaje de fermentación……	95
9	Análisis físicos y químicos de las musáceas utilizadas durante el ensayo……	96
10	Análisis físicos y químicos de los híbridos utilizadas durante el ensayo……	96
11	Imágenes de la investigación en el campo…….	97
12.	Imágenes de la investigación en el laboratorio (RUMEN)……	99

CÓDIGO DUBLIN

Título:	Estudio de la actividad microbiana durante el proceso de fermentación en Híbridos de cacao (*Theobroma cacao* L.*)* mediante la adición de musáceas				
Autor:	Gina Aidee Rivera Benites				
Palabras claves:	cacao	musáceas	fermentación	microorganismos	UFC g^{-1}
Fecha de publicación:					
Editorial:					
Resumen:	El objetivo de la presente investigación fue evaluar la actividad microbiana mediante la adición de dos musáceas como fuente de energía durante el proceso de fermentación de almendras en híbridos experimentales de cacao *(Theobroma cacao* L.*)*. La evaluación se realizó en el Laboratorio de Rumiología y Metabolismo Nutricional (RUMEN) de la Finca Experimental "La María" perteneciente a la Universidad Técnica Estatal de Quevedo provincia de Los Ríos, durante un periodo de campo de un mes (Enero) aproximadamente. Se empleó un diseño completamente al azar (DCA) con arreglo factorial 2x4, realizando la prueba de Tukey al 5% de probabilidad, se manejaron ocho tratamientos y cuatro repeticiones, teniendo como factor A las híbridos (DIRCYT-258, 259, 263 y 265), y como el Factor B las musáceas (Puré de banano y plátano), se manejaron 576 unidades experimentales por tiempo de fermentación de cacao (24, 48 y 72 horas), así mismo se empelo el 10% de masa de las musáceas para el proceso fermentativo y se utilizó la disolución decimal 10^{-3} para la siembra de los microorganismos evaluados (bacterias acido lácticas, acéticas y levaduras), los resultados mostraron interacción para levaduras durante las 48 horas de haber iniciado el proceso de fermentación con respecto a unidades formadoras de colonias UFC g^{-1}, mientras que para las bacterias acido lácticas y acéticas, no fue significativo				

	durante el tiempo evaluado pues estas se mantuvieron a la par con la población microbiana, concluyendo que la adición de dos musáceas como fuente de energía durante el proceso de fermentación de almendras en híbridos experimentales de cacao no generó un aumento en el número de unidades formadora de colonias UFC g^{-1} durante el proceso de fermentación.
Abstract:	The objective of scientific research is the evaluation of microbial activity by adding two sources as energy source during the fermentation process of almonds in experimental cocoa (Theobroma cacao L.) hybrids. The evaluation was carried out in the Laboratory of Nutrition Rumiology and Metabolism (RUMEN) of the Experimental Farm "La María", belonging to Quevedo State Technical University of Los Ríos province, during a field period of approximately one month (January). (DCA) with a 2x4 factorial arrangement, performing the Tukey test at 5% probability, eight treatments and four replications were managed, with hybrids (DIRCYT-258, 259, 263 and 265) as the A factor, Y as Factor B The plants (Banana puree and banana), 576 experimental units were handled for the fermentation time of cocoa (24, 48 and 72 hours), as well as 10% mass of the musaceae for the fermentation process. 10^{-3} decimal solution for the sowing of the evaluated microorganisms (lactic acid bacteria, acetic acid and yeast), the results showed interaction to raise during the 48 hours of starting the fermentation process with respect to the colony forming units UFC g^{-1}, whereas for acidic and acetic bacteria, it was not significant during the time evaluated as these were kept in tandem with the microbial population, conclude that the addition of two ways as they were Of energy during the fermentation process of almonds in hybrid cocoa experiments did not generate an increase in the number of colony

	forming units UFC g $^{-1}$ during the fermentation process.
Descripción:	104 hojas: dimensiones, 29 x 21cm + CD-ROM
Uri:	

INTRODUCCIÓN

Una de las partes del árbol de cacao *(Theobroma cacao* L.*)* más utilizada son las semillas o almendras, y de éstas comestibles son sus cotiledones, los cuales sufren transformaciones esenciales durante la fermentación y el secado.

El cacao es uno de los cultivos más importantes para el Ecuador, atendiendo con su producción el 5% de la demanda mundial, siendo uno de los cultivos tradicionales de interés comercial, social, económico y cultural en la provincia de Los Ríos (1). La importancia de este radica en que se cultiva desde época de la colonia; después del banano y flores es la más importante cadena agrícola por su participación en los productos de exportación no petrolera y el gran número de derivados con valor agregado que pueden realizarse (2,3).

Al concluir el 2015 las exportaciones ecuatorianas de cacao cerraron alcanzando un volumen total de 260 mil toneladas métricas, de cacao en grano y productos derivados de cacao, siendo sus principales destinos Estados Unidos de Norte América y Europa (4), caracterizando al país como el principal productor de cacao fino de aroma.

La fermentación del cacao, es sin duda una acción realmente indispensable para el desenvolvimiento adecuado de los precursores del aroma en la producción de chocolate de óptima calidad, ya que durante esta etapa, la pulpa que envuelve las semillas son metabolizadas por microorganismos que producen compuestos como el etanol, el ácido acético y láctico formados en primera instancia, los cuales serán absorbidos por los cotiledones, promoviendo varios cambios fisicoquímicos y enzimáticos , que tendrán notable influencia en el sabor final (5).

Los microorganismos llevan a cabo la fermentación en la pulpa, que contiene carbohidratos (glucosa, fructosa y sacarosa), y un valor de acidez (pH) entre 3.3 y 4.0; debido a la presencia de ácido cítrico, además de ser esenciales para preparar el grano, pues sin ellos no se eliminaría el mucílago, y no se eliminaría la acidez del grano, causada por la presencia del citrato, y sin la producción del ácido acético, el etanol y la temperatura alta, el grano de cacao no se dañaría, dando lugar a la acción de sus enzimas (6).

La calidad del sabor y aroma de las almendras está estrechamente relacionada al origen del material y a los procesos de postcosecha (fermentado y secado), los cuales determinan el resultado del desarrollo de las actividades microbianas y de procesos fisicoquímicos de las semillas, puesto a esto la presente investigación pretendió en el proceso de fermentación intensificar dichas reacciones mencionadas mediante la adición de dos musáceas como fuente de energía, cuya inclusión será importante en las actividades para el incremento de la producción de precursores de sabor que permita mejorar características organolépticas requeridas por la industria.

CAPÍTULO I

CONTEXTUALIZACIÓN DE LA INVESTIGACIÓN

1.1. Problema de la investigación

1.1.1. Planteamiento del problema.

La capacidad de producción del cacao (*Theobroma cacao* L.) en nuestro país es un importante ingreso económico aceptable para los productores, por ende crece la necesidad de aprovechar la producción de materia prima que permite la elaboración de producto a base de cacao, destinados para la industria chocolatera debido al gran consumo en el mercado por sus propiedades (7).

La duración de fermentación de cacao varían según las poblaciones de plantas y genotipos (cultivares), además las condiciones ambientales del cultivo también contribuyen a la composición, el sabor y la calidad de los granos de cacao secos fermentados (8,9), pero muchas veces este tiempo de fermentación se extiende por varios días provocando inconvenientes durante el proceso de la obtención de la materia prima.

La calidad del cacao principalmente radica en la etapa de post cosecha o beneficiado, tiempo en el cual las almendras de cacao son tratadas en condiciones adecuadas con el fin de cumplir una serie de transformaciones físicas, químicas, microbiológicas y enzimáticas que permiten el desarrollo de su calidad en cuanto a su aroma y sabor. Es un punto importante en que el cacao ha sufrido una adecuada fermentación y proceso de secado, determinando así las etapas cruciales en la producción de las propiedades organolépticas (10).

En la actualidad la mayoría de los agricultores de pequeña y mediana escala, solo se encargan en tratar de producir la materia prima, más no en procurar tener un proceso adecuado de fermentación, olvidando así la importancia del desarrollo de los precursores del sabor y aroma en las almendras, factor esencial que permite realzar la calidad de sus productos.

El Ecuador ha logrado distinguirse a nivel mundial por ofrecer un cacao diferente y de alta calidad, produciendo productos como la variedad Nacional que son apetecidos por los mercados internacionales caracterizados por su sabor y aroma, obteniendo así ventajas frente a los demás países productores.

Sin duda alguna la mala práctica y desconocimiento técnico ha catapultado que los agricultores realicen hábitos inadecuados en la fermentación de sus semillas, produciendo características no tan agradables en sus productos, que en el momento de comercializarlos ocurre disminución de precios y por consiguiente baja competitividad en el mercado.

Puesto a esto, la buena calidad del cacao no solo depende de su variedad, sino también en gran medida del proceso post cosecha al cual es sometido (11), es por esto que el conjunto de los procesos como la fermentación y secado del cacao permite la obtención de chocolates de alto relieve, obteniendo mayor demanda por las industrias.

Por ende, en esta temática se plantea la presente investigación mediante en la cual se adicionó dos musáceas como fuente de energía durante la etapa de fermentación que permita incrementar la población microbiana durante este proceso, mostrando una alternativa diferente e innovadora que pueda ser transmitida y usadas por los productores, realzando así un intercambio científico y tecnológico.

1.1.2. Formulación del problema.

¿La adición de dos musáceas como fuente de energía durante el proceso de fermentación demostrará el incremento de la población microbiana de las almendras en híbridos experimentales de cacao?

1.1.3. Sistematización del problema.

- ¿Cuál es el efecto de la inclusión de musáceas como fuente de energía en la actividad microbiana durante el proceso de fermentación en híbridos experimentales de cacao?

- ¿Qué efecto tiene la adición de musáceas como fuente de energía durante el proceso de fermentación sobre el pH y acidez titulable de las almendras en híbridos experimentales de cacao?

- ¿Cuál será el material vegetativo que obtenga el mayor porcentaje de fermentación de las almendras de cacao mediante la adición de musáceas como fuente de energía?

1.2. Objetivos

1.2.1. Objetivo general.

Evaluar la actividad microbiana mediante la adición de dos musáceas como fuente de energía durante el proceso de fermentación de almendras en híbridos experimentales de cacao *(Theobroma cacao* L.*).*

1.2.2. Objetivos específicos.

- Determinar el efecto de la adición de musáceas como fuente de energía en la población microbiano (Bacterias lácticas, acéticas, mohos y levaduras) durante el proceso de fermentación en híbridos experimentales de cacao.

- Analizar las variables físicas-químicas (pH, temperatura, acidez titulable y grados Brix) del proceso de fermentación mediante la adición de musáceas como fuente de energía en híbridos experimentales de cacao.

- Indicar el hibrido que obtenga mayor porcentaje de fermentación en las almendras de cacao mediante la adición de musáceas como fuente de energía.

1.3. Justificación.

Durante las últimas décadas en el contexto de la globalización económica surgen una serie de reformas orientadas a una mayor apertura comercial y liberación de la economía, lo cual exige mejorar la competitividad. En este sentido, se puede decir que una de las aristas de la competitividad se vincula directamente con el mejoramiento de calidad de los producto (12).

El proceso post-cosecha del cacao es el factor de mayor influencia en el desarrollo del sabor y aroma a chocolate, sea cual sea su condición genética; por tanto, constituye un factor fundamental para la obtención de un grano de alta calidad, que permita su correcta comercialización en el mercado internacional. Este proceso incluye dos fases: la fermentación y el secado (13).

Estos procesos ocasionan que las paredes celulares se destruyan, permitiendo que los contenidos de la semilla estén expuestos a otros constituyentes químicos que afectan sus propiedades organolépticas. El aroma del cacao es una condición innata, los tratamientos postcosecha, incluida la torrefacción, son los factores determinantes de la expresión de ese potencial aromático y sensorial. La calidad del cacao es integral debido a que la tendencia de los mercados industriales es identificar nuevos sabores especiales (14,15).

Sin embargo durante las primeras etapas del proceso de fermentación de cacao, los microorganismos juegan un rol fundamental dentro de estas, ya que la pulpa de las almendras son un medio rico para el crecimiento microbiano, iniciando la acción de levaduras, bacterias lácticas y acéticas para facilitar la eliminación de la pulpa viscosa alrededor de los granos y su subsiguiente secado.

Para esto el proceso de fermentación es de vital importancia, ya que se desarrolla los llamados precursores del aroma y disminuye la astringencia y la acidez de los granos de cacao (16), por lo que se debe manejar adecuadamente cada una de las actividades que conciernan las transformaciones del proceso.

Ante lo expuesto, se propuso la adición de musáceas como fuente de energía durante la etapa de fermentación que permita incrementar la población microbiana de las almendras en híbridos de cacao, de manera que se pueda reducir en cierto modo el tiempo de fermentación y

obtener las mejores características para poder realizar el intercambio de conocimientos y técnicas que beneficien a los pequeños y medianos productores de este cultivo.

CAPÍTULO II

FUNDAMENTACIÓN TEÓRICA DE LA INVESTIGACIÓN

2.1. Marco conceptual.

El cacao (*Theobroma cacao* L.).

El cacao (*Theobroma cacao* L.), es una planta malvácea umbrófila; cauliflora; hermafrodita, y pentámera. Crece de forma espontánea desde el sur de México a Bolivia en la Selva Amazónica. Se agrupada en *Forasteros, Criollos* y *Trinitarios*. Tiene una característica de autoincompatibilidad controlada por genes y procesos bioquímicos, la acción del etileno, ácido abscísico y el ácido indolacético (puede acarrear la abscisión floral). El cacao es una especie diploide, (2n = 20) con amplia variabilidad genética debida a factores genéticos y climáticos (17).

Fruto de cacao.

El fruto es una baya o mazorca ovoidea, grande, y aguda hacia el ápice, de unos veinticinco a treinta centímetros de largo y de diez a quince de grosor, con un pedúnculo recio y recto, epicarpio grueso, subleñoso, consistente, con diez surcos longitudinales; las semillas son ovoides, blancas y pardas cuando están secas; la almendra es de unos dos centímetros de sabor muy amargo (18).

Cosecha.

Consiste en la acción de recolectar y abrir las mazorcas maduras con el objetivo de extraer las almendras o semillas y colocarlas en cajas fermentadoras.

Fermentación.

La fermentación es una de las etapas realizadas después de la post cosecha, que más afectan a la calidad de productos obtenidos a partir de cacao (19).

La razón principal para la fermentación de cacao es inducir transformaciones bioquímicas dentro de los granos que llevan el desenvolvimiento de precursores del sabor de chocolate. Sin este tratamiento, los granos de cacao son excesivamente amargos, ácidos y astringentes, y cuando son procesados no desarrollan el aroma y sabor característico del chocolate (20).

Bacterias lácticas.

Las bacterias lácticas (BAL) son un grupo de microorganismos representados por varios géneros con características morfológicas, fisiológicas y metabólicas en común. En general las BAL son cocos o bacilos Gram positivos, no esporulados, no móviles, anaeróbicos, microareofílicos o aerotolerantes; oxidasa, catalasa y bencidina negativas, carecen de citocromos, no reducen el nitrato a nitrito y producen ácido láctico como el único o principal producto de la fermentación de carbohidratos (21,22).

Bacterias acéticas.

Las bacterias acéticas (BA) son Gram negativas, de entre 0.4 y 4.5 µm de largo y entre 0.4 - 1 µm de ancho, con forma elipsoidal y que pueden presentarse de manera individual, en parejas o en cadenas. Presentan flagelos de forma peritroca o polar, y no pueden formar endosporas como estructura de supervivencia. Este grupo de microorganismos necesita del oxígeno como aceptor final de electrones, por lo que tienen un metabolismo aerobio obligado. Generalmente, las BA son catalasas positivas, oxidasa negativa y pueden utilizar el etanol como fuente de carbono (23).

Mohos y levaduras.

Tanto mohos como levaduras son eucariontes, pero las levaduras son unicelulares y están ampliamente distribuidas por la naturaleza sus células son ovales, esféricas o alargadas y no son móviles; en tanto que el moho es multicelular, filamentoso, no móvil y ramificado (24), (25).

Musáceas.

Las musáceas son plantas herbáceas perennes de la familia de las monocotiledóneas, famosas por sus frutos comestibles como la banana que se emplean a nivel comercial.

2.2. Marco referencial.

2.2.1. Origen.

El cacao es originario de América y muy especialmente de la Amazonía, su domesticación, cultivo y consumo se inició en Centroamérica en tiempos precolombinos. Theobroma cacao L. fue cultivado por primera vez en los años 250-900 D.C. por las antiguas civilizaciones de los Mayas y los Aztecas de la región mesoamericana. Los Toltecas, Aztecas y Mayas procesaban esta pepa y producían una bebida llamada - xocoatl‖. En forma acelerada los europeos incorporarían en su dieta el consumo de cacao bajo la forma de chocolate, añadiendo azúcar a la mezcla. Desde sus orígenes divinos, el cacao se introdujo en la corte española a mediados del siglo XV. El cacao ha tenido muchos usos, que van desde la medicina a la moneda, en las primeras culturas mesoamericanas. Más de 100 usos medicinales del cacao se han documentado en Europa y Nueva España (26,27).

A continuación, se muestra la taxonomía del cacao en la tabla 1:

Tabla 1. *Taxonomía del Cacao.*

REINO	**Plantae**
SUBREINO	*Tracheobionta*
DIVISIÓN	*Magnoliophyta*
CLASE	*Magnoliopsida*
SUBCLASE	*Dilleniidae*
ORDEN	*Malvales*
FAMILIA	*Malvaceae*
SUBFAMILIA	*Sterculioideae*
TRIBU	*Theobromeae*
GENERO	*Theobroma*
ESPECIE	*cacao* L.

FUENTE: DOSTERT *et al* (28).

2.3. Cacao.

El árbol del cacao pertenece al género Theobroma, es una planta tropical que crece sólo en climas calientes y húmedos. Es por eso que se sitúan a 20 grados de latitud Norte y 20 grados de latitud Sur. Es decir, que necesita una temperatura constante de cerca de 24-26 °C, lluvias abundantes y regulares, y un suelo rico en potasio, nitrógeno y oligoelementos (18).

2.3.1. Cultivo de Cacao en el Ecuador.

El cacao es uno de los más significativos símbolos del Ecuador, por ser el producto de exportación más antiguo del País.

Caracterizado por poseer un tipo de cacao único en el mundo distinguido con el nombre de *"Nacional"*, el cual se lo reconoce por tener una fermentación muy breve y dar un chocolate suave de buen sabor y aroma, por lo que es reconocido a nivel mundial con la categorización fino o de aroma. Así mismo, desde el siglo XIX el cacao era cultivado en zonas de la cuenca alta de los ríos Daule y Babahoyo, los cuales constituyen el Río Guayas y era trasportado hasta el puerto de Guayaquil para su exportación, razón por la cual se le dio el nombre de *"cacao arriba"* proveniente de las zonas de *rio arriba"* arriba en el argot del pueblo (29).

La superficie de cacao en el Ecuador está distribuida a lo largo de 21 provincias, de acuerdo con el Instituto Nacional de Estadística y Censos, la superficie plantada de cacao fue de 508 885 ha, de este total, el 75.71% posee de la costa, el 15.25% de la sierra y el 9.04% del oriente. En la costa Guayas tiene la 4 mayor superficie plantada de cacao con el 21.39%, le sigue Los Ríos con 20.72% y Manabí con el 19.22%. En la sierra la provincia de mayor superficie plantada de cacao es Santo Domingo de los Tsáchilas con el 4.78%, mientras que en el oriente destaca la subregión Nororiente (Sucumbíos, Orellana y Napo) 7.95% (30).

2.3.2. Tipos de Cacao.

A nivel mundial se conocen cacaos tipo: Criollo, Forastero amazónico, Trinitario y Nacional del Ecuador que junto al criollo son denominados como fino de aroma. A continuación se describe las principales características de cada tipo de cacao (31).

2.3.2.1. Cacao Criollo.

En este grupo están incluidos genotipos con almendras dotadas de cotiledones de color blanco marfil, presentes principalmente en América central, Mexica y sectores de Venezuela y Colombia (32). Las mazorcas usualmente tienen una forma alargada con punta acentuada en el extremo inferior, el color de la mazorca tiene gran variabilidad con tonos casi blanco a verde oscuro y de rojo a rosado, este tipo de cacao requiere de dos a tres días para completar su fermentación aromática (33).

2.3.2.2. Cacao Forastero.

En el grupo de los cacaos Forasteros, se incluyen los llamados cacaos corrientes del Brasil y los que se cultivan en el oeste africano, son originarios de las alta Amazonia (34), y se les asigna esta dominación porque se atribuyen en la cuenca de ríos que lleva este nombre. La zona localizada entre los ríos Napo, Putumayo y Caquetá en América del Sur está considerada como el centro genético de este grupo, las mazorcas están dotadas de surcos y rugosidades notables, las almendras producen un chocolate con un sabor básico de cacao (13).

2.3.2.3. Cacao Trinitario.

Lo establecen las poblaciones hibridas en cruzamientos, espontáneos de criollos y amelonados (Forasteros) con características de mazorcas y almendras particularmente similares en su mayoría a los dos grupos que le otorgan su principio, pero especialmente de coloración rojiza (35). Ocupa del 10 al 15% de la producción mundial, dentro de esta variedad encontramos el Clon CCN-51, dicho material oferta características de elevada producción y tolerancia a enfermedades, no tiene ese aroma característico como lo es su primo el Nacional (36).

2.3.2.4. Nacional.

La variedad Nacional en el Ecuador se lo ha considerado como un tipo de cacao Forastero, debido a la forma de la mazorca, pues estas son amelonadas con estrangulaciones en la base y el ápice de la misma, surcos y lomos poco profundos, debido posee una rápida fermentación y es reconocido a escala mundial por producir un chocolate suave y de buen aroma y sabor (37).

Las almendras son moradas claras, el mucilago es poco abundante, y este mucilago tiene un sabor más dulce que los tipos Trinitarios y Forasteros, los cuales son ligeramente acido. Cuando se mastica el cotiledón, sin la testa de la semilla presenta un sabor ligero amargo y muy poca astringencia y es aquí cuando se puede detectar el olor y sabor floral que se siente intenso en el paladar (38).

2.3.3. Características del fruto.

El fruto del árbol de cacao es denominado comúnmente mazorca, posee una cascara dura y firme, con relieves simétricos y longitudinales, su fruto es sostenido por un pedúnculo, el cual da la flor original. En su parte interna presenta cinco hileras de semillas o almendras y está compuesto de tres partes: exocarpio o sección exterior, mesocarpio o capa de en medio y endocarpio o capa interior (39).

Y el periodo comprendido entre la fecundación y madurez va desde los cincos hasta los siete meses, y una mazorca alcanza un peso promedio de 400 g según la variedad (40).

Se detalla a continuación la composición química de la mazorca de cacao en la tabla 2:

Tabla 2. *Composición química de la cascara de la mazorca de cacao.*

COMPONENTE	% p/p
Humedad	85
Proteína	1.07
Minerales	1.41
Grasa	0.02
Fibra	5.45
Carbohidratos	7.05
N	0.171
P	0.026
K	0.545
Pectinas	0.89

FUENTE: MEJIA & ARGUELLO (40).

2.3.4. Características de la semilla.

El cacao son semillas del árbol, que vienen en una mazorca. Ésta tiene entre 30 y 40 granos envueltos en una sustancia mucilaginosa de aspecto gelatinoso. El cacao crudo tiene un sabor astringente desagradable, de manera que debe ser tratado mediante un proceso en el que los microorganismos, a través de una fermentación, modifiquen sus componentes. Posteriormente los granos son secados y tostados, para que se desarrollen las características sensoriales óptimas para la fabricación del chocolate (41).

Los principales compuestos del grano o semilla de cacao son agua, grasa, compuestos fenólicos, materia nitrogenada (proteínas y purinas incluyendo teobromina y cafeína), almidón y otros carbohidratos, además de materia inorgánica. Dichos componentes, acompañados también con la calidad de los granos, dependerán de factores intrínsecos y extrínsecos, como lo son el tipo genético; origen y características geográficas; grado de madurez, de fermentación y de secado (42).

En la tabla 3, se muestra la composición química de la semilla de caco:

Tabla 3. *Composición química de la semilla de cacao.*

COMPONENTE	% p/p
Manteca de cacao	54
Proteína	11.5
Ácidos orgánicos y aromas	9.5
Celulosa	9
Ácidos tánicos y color	6
Agua	5
Sales minerales	2.6
Teobromina	1.2
Azucares	1
Cafeína	0.2

FUENTE: MEJIA & ARGUELLO (40).

2.3.5. Beneficiado.

El proceso de beneficiado incluye las etapas de fermentación y secado de las almendras. Este proceso se inicia con la recolección de las mazorcas, las que se clasifican para separar las enfermas, evitando recolectar las que no tengan un grado de madurez adecuado para garantizar que solo se beneficien los frutos maduros y sanos para luego realizar la apertura de las mazorcas y extraer las almendras (43).

2.3.6. Fermentación.

La fermentación es un proceso microbiológico y bioquímico que conduce a la eliminación de la pulpa o mucílago, provoca la muerte del embrión, activa las reacciones bioquímicas en el interior de los cotiledones e intensifica el desarrollo de los precursores del aroma térmico del chocolate (44).

Este proceso inicia con la proliferación de las levaduras, debido al bajo pH (3.4 a 4.0) de la pulpa por la presencia de ácido cítrico (2%), el alto contenido de glucosa (12-15%), pectinas

(5-7%) y la baja tensión de oxígeno que favorecen su crecimiento. Las levaduras dominan la fermentación entre 24 y 36 h después de iniciado el proceso (45).

Posteriormente los cambios de pH y de la estructura de la pulpa permiten la entrada de pequeñas cantidades de aire que favorecen el establecimiento de una flora láctica: *Leuconostoc, Lactobacillus, Streptococcus*. Después de la primera remoción, la presencia de oxígeno en la masa de cacao favorece el establecimiento de una flora acética: *Acetobacter rancens, A. ascendes, A. xylinum, A. lovaniensis, A. aceti y Gluconobacter oxydans*, éstas aprovechan el etanol para producir ácido acético. Este es un punto clave del proceso, el ácido acético provoca una baja del pH que junto con el calor de la fermentación (50°C) causan la muerte de las almendras durante el segundo día de fermentación. La muerte de las almendras está acompañada de un aumento en la permeabilidad de las paredes celulares, lo cual permite la interdifusión de los componentes del jugo celular, en esa forma las enzimas se ponen en contacto con los polifenoles y las proteínas (44,35).

Tan pronto perece la semilla, la enzima glicosidasa se activa hidrolizando las antocianinas (3-β-D-galactosidil cianidina y la 3-α- L- arabinosidil cianidina) responsables del color púrpura de las almendras, que gradualmente van perdiendo su color debido a la descomposición de azúcares y antocianidinas, éste último luego será oxidado a compuestos quinónicos que contribuyen al color pardo característico del cacao fermentado (45,46).

Después, las procianidinas y las proteínas o los productos de su degradación se combinan durante esta etapa. Ninguna de estas reacciones incluye oxígeno. Durante la fase de fermentación debe mantenerse una aireación que no sea muy escasa, porque impediría la multiplicación de las levaduras y bacterias acéticas, que estaría acompañada de una reducción de ácido acético y del calor generado, ni tampoco excesiva, por cuanto en este caso no solamente daría lugar al desarrollo de mohos, sino que también impediría la formación del precursor del sabor (35).

2.3.6.1. Acción de los microorganismos en la fermentación.

El proceso de fermentación del cacao es natural o espontaneo, ya que no se añaden intencionalmente los microorganismos a los granos, que de hecho se encuentran estériles

dentro de las vainas. Se contaminan con microorganismos provenientes de todas las superficies con las que entran en contacto: los utensilios y las manos de las personas que manipulan el cacao (6).

Durante la fermentación, se da las siguientes fases, las cuales ocasionan una sucesión de poblaciones de microorganismos:

2.3.6.2. Primera Fase.

En la primera fase aparecen entre 5 y 6 especies diferentes de levaduras, que luego desaparecen dejando su lugar a *Hanseniaspora guilliermondii,* que es la levadura predominante durante las primeras 24 horas. A *Hanseniaspora* sólo se le encuentra ocasionalmente en las fases posteriores. La levadura *Candida zemplinina* es una nueva especie que sólo se pudo detectar hasta que aparecieron las técnicas modernas de la biología molecular que detectan la presencia de microorganismos por sus genes, más no cultivándolos. *Candida silvae, Candida zemplinina* y *Candida diversa* son levaduras que se encuentran comúnmente en las fermentaciones en charolas, posiblemente por la mayor concentración de oxígeno en ese tipo de fermentación. Se reporta que a las 36-38 horas dominan *Saccaromyces cerevisiae* y *Pichia membranaefaciens*, que se encuentra al final de la fermentación; *Candida krusei* y *Hanseniaspora guilliermondii*, en las fermentaciones en charolas, y predomina también Saccharomyces cerevisiae (47).

Dentro de la fermentación del cacao participan un gran número de especies de microorganismos, algunos de los cuales no se han reportado en otros ambientes o fueron aislados inicialmente del cacao. Este es el caso de nuevas levaduras como *Candida halmiae, Geotrichum ghanense, Candida awuaii* (46).

2.3.6.3. Segunda Fase.

Se favorece el desarrollo de bacterias lácticas, que fermentan los carbohidratos residuales y continúan el consumo del ácido cítrico. En las fermentaciones de pilas se han aislado sobre todo bacterias del tipo *Lactobacillus* (*Lb. collonides, Lb. fermentum, Lb. mali* y *Lb.*

plantarum), aunque también se han identificado bacterias como *Leuconostoc pseudomes enteroides, Leuconostoc pseudoficulneum* y *Pediococcus acidilactici, l*as levaduras contienen enzimas del tipo "pectinolítico", lo que les permite hidrolizar las pectinas, ocasionando una disminución de la viscosidad de la pulpa de mucílago y favoreciendo la entrada de aire. Con este ambiente aerobio y menos ácido -debido al consumo de ácido cítrico- se favorece el desarrollo de bacterias acéticas (6).

2.3.6.4. Tercera Fase.

En esta fase ocurre un cambio importante en términos de los productos de la fermentación, ya que intervienen bacterias acéticas que llevan a cabo la transformación del etanol que produjeron las levaduras en ácido acético, tal como ocurre en la industria productora de vinagre. Dado que la transformación de etanol en ácido acético es una reacción exotérmica, se produce calor. El etanol y el ácido acético se difunden hacia el interior de los granos y, junto con la temperatura alta, matan al embrión. Las más importantes bacterias acéticas que se han aislado de la fermentación del cacao, son: *Gluconobacter oxydans, Acetobacter aceti* y *Acetobacter pasteurianus*. Se encuentra primero *Gluconobacter oxydans,* luego *A. syzygii* y *Acetobacter pasteurianus* y, al final de la fermentación, *Acetobacter tropicalis* (45).

2.3.6.5. Cuarta Fase.

En la cuarta y última fase de la fermentación, que se desarrolla entre las 48 y las 60 horas, se detectan bacterias del género *Bacillus*. Al voltear la pila de granos, se favorece la presencia, en las partes externas, de *B. licheniformis, B. megaterium, B. pumilus* y un grupo pequeño de *B. subtilis, B. megaterium* y *B. pumilus* (6).

Las altas temperaturas favorecen el desarrollo de bacterias del género *Bacillus*, conocido por la producción de numerosas enzimas, que catalizan reacciones cuyos productos dan al cacao sabores y olores desagradables, como las proteolíticas, que degradan las proteínas y las lipolìticas, que actúan sobre las grasas; pero podrían contribuir en el sabor con la producción de ácidos orgánicos y saborizantes, como 2,3-butanodiol (48).

2.3.7. Bacterias ácidas lácticas (BAL).

Las bacterias acido lácteas se ubican en la familia Lactobacillaceae, pertence al grupo de las bacterias Gram-positivas, las cuales son microorganismos anaerobios y estrictamente fermentativos; los carbohidratos les resultan indispensables para su buen desarrollo, pues estos los fermentan para dar lugar al ácido láctico, alcohol y dióxido de carbono como subproductos; estos no desarrollan olores típicos al crecer en medios comunes, pero sin embargo contribuyen a modificar el sabor de alimentos fermentados, produciendo compuestos volátiles (49).

Las cepas especificas del cacao son las Lactobacillus fermentum ya que encuentran mejores adaptadas al medio de la pulpa de cacao, ya que ellas fermentan glucosa a ácido láctico y ácido acético, y reducen fructosa a manitol conviertiendo ácido cítrico en ácido láctico y 2,3-butanodiol (50).

El ácido láctico y manitol producidos podrían ayudar y servir como fuentes de energía adicionales para las especies BAA, mientras que la conversión de ácido cítrico resulta un aumento en el pH y una posible contribución al aroma de cacao; así, las cepas de BAL, ya sea como monocultivo o co-cultivo, serán componentes esenciales de cultivos iniciadores direccionados al control de los procesos de beneficiado de granos de cacao para obtener granos de cacao secos bien fermentados y mejores estándares de degustación y calidad de chocolates producidos (49).

2.3.8. Bacterias ácidas acéticas (BAA).

Las bacterias ácido acéticas se encuentran en la familia Acetobacteraceae, las cuales son bacterias aeróbicas Gram-negativa.

Una característica común de las Bacterias Ácidas Acéticas, es la capacidad para oxidar etanol a ácido acético bajo condiciones de pH neutral y ácido (pH 4.5). Debido a esta BAA están a menudo involucrados en la producción de alimentos fermentados, sea de formas beneficiosas (productos de chocolate, café, vinagre, crema de coco y cervezas especiales) como perjudiciales. Las bacterias acéticas contribuyen al desarrollo del cacao de alta calidad, por

jugar un rol crítico en la fermentación espontánea de los granos de cacao, considerado como el primer paso en la producción de chocolate (51).

2.3.9. Mohos.

Los mohos son organismos heterotróficos y osmotróficos, con quitina en la pared celular, los filamentos que constituyen el micelio se denominan hifas, estas pueden estar separadas en secciones generalmente multinucleadas por medio de septos perforados, o bien pueden carecer de éstos. Los mohos se reproducen asexualmente en la mayoría de los casos y sus estructuras sexuales sólo aparecen cuando las circunstancias son favorables o se encuentran micelios de distinta polaridad (52), su crecimiento en los alimentos se distingue fácilmente por su aspecto aterciopelado o algodonoso.

2.3.10. Levaduras.

Las levaduras son hongos que generalmente crecen por gemación, en forma de agregados sueltos de células independientes y que sobre los medios de cultivo forman colonias pastosas, constituídas en su mayor parte por células aisladas que suelen ser esféricas, ovoideas, elipsoideas o alargadas. Unas pocas presentan hifas. Las dimensiones pueden oscilar de 1 a 9 µm de ancho y 2 a más de 20 µm de longitud según la especie, nutrición, edad y otros factores. Algunos hongos fitopatógenos forman colonias levaduriformes en cultivos axénicos y varios patógenos de animales se presentan como levaduras en los materiales clínicos (53) y a diferencia de los mohos, las levaduras no pueden identificarse únicamente por sus caracteres morfológicos; ya que se requiere la ayuda de pruebas bioquímicas para su identificación específica.

2.3.11. Investigaciones relacionadas a la investigación.

Según Almicar *et al.*, 2015 (54), en su trabajo de investigación *"Estandarización Del Proceso De Fermentación De La Mezcla De Semillas De Tres Accesiones De Theobroma Cacao L. (Cacao) Del Cultivar San José Del Real De La Carrera Ubicada En El Departamento De Usulutan"*, identificaron y cuantificaron los microorganismos involucrados en el proceso de fermentación: bacterias aerobias, lácticas, acéticas, hongos y levaduras, además se determinó pH e índice de fermentación. La identificación de los microorganismos se realizó por tinción de gram observando al microscopio y los recuentos se realizaron en los medios plate count, papa dextrosa, RAE, carbonato y MRS, obteniendo conteos mayores de bacterias aerobias, hongos y levaduras en los primeros 3 días de fermentación, las bacterias acéticas y lácticas presentaron recuentos mayores los días 4 y 5 de fermentación. También monitorearon la temperatura y pH, en los recipientes de fermentación y observaron que los días 4 y 5 se eleva la temperatura debido al proceso exotérmico generado por los microorganismos presentes en el medio, el pH disminuye en días 4 y 5 de fermentación, debido al crecimiento de las bacterias acéticas y lácticas, que degradaron los alcoholes, generados durante la fermentación, en ácido acético y láctico respectivamente.

Así mismo Prado & Zambrano., 2015 (55), en su proyecto de investigación *"Caracterización del Proceso de Fermentación del Cacao Variedad Nacional Mediante el Uso de Técnicas Moleculares y de Detección de Compuestos de Aroma"*, determinaron los diferentes microorganismos hallados durante cada uno de los días de fermentación, encontrando que durante el día cero de fermentación se encuentra una serie de compuestos atribuibles a bacterias lácticas y acéticas. De las cuales se puede observar que las únicas que establecen diferencias significativas en cuanto a la producción de etanol y benzeetanol (para el caso de las lácticas) fue el *Lactobacillius nagelii.* Así mismo, en el caso de las bacterias acéticas, se encuentra que tan solo *Acetobacter pasteurianus* tuvo incidencia en la formación de ácido acético y benzaldehídos; en los días 2 y 3 de fermentación se halló presencia de bacterias acéticas como el *Acetobacter pasteurianus, Acetobacter syzygii,* finalizando el cuarto dia con *Acetobacter ghanensi,* esta última también se encuentra en el día dos pero al no presentar grandes diferencias en relación a los otros días de fermentación, su producción de compuestos

no fue considerado significativo. Para posterior el cuarto día continua la actividad de los *Bacillus amyloliquefaciens* y *Bacillus subtilis*, así como también del *Acetobacter pasteurianus* y *Acetobacter ghanensis*, todos ellos marcan una diferencia significativa en cuanto a la presencia de ácidos, aldehídos y benzenos, marcando una relación existente entre los microrganismos presentes durante la fermentación y la generación de compuestos específicos de aroma del cacao.

Así como Sinche., 2013 (10), en su trabajo investigativo "*Evaluación de dos tiempos de fermentación con las adición de la enzima polifenol oxidasa y levadura Saccharomeces Cerevisae para mejorar las características de calidad (aroma y sabor) del cacao CCN-51"*, indicó que las pruebas sensoriales efectuadas durante la fermentación de 7 días, logro obtener los mejores resultados en cuanto a acidez, amargor, astringencia, floral y una aceptabilidad agradable en cuanto al aroma, mientras para el pH, los resultados se mantuvieron dentro del rango establecido, así como se produjo un aumento del 6.44% en el costo de producción en comparación con una muestra en blanco.

Como también Navia *et al*., 2012 (5), en su ensayo *"Mejoramiento de las Características Sensoriales del Cacao CCN51 a través de la Adición de Enzimas durante el Proceso de Fermentación"*, determinaron que las dos enzimas estudiadas: polifenoloxidasa de piña y una proteolítica de origen fúngico con actividad endo/exopeptídica "Prozyn flavour" fueron superiores al blanco en las cualidades como intensidad aromática, fruta fresca, sabor a chocolate, y fruta seca; así también la astringencia del licor de cacao tratado con fermentación enzimática con polifenoloxidadas no presentó diferencia al blanco pero se evidenció diferencia significativa en los resultados de las evaluaciones; Sin embargo en la evaluación sensorial descriptiva, se obtuvieron mejores resultados al adicionar la enzima con actividad endo/exopeptídica, mostrando un mayor nivel de preferencia de los jueces entrenados.

A su vez Alas & Ríos., 2012 (56), en su investigación "*Evaluación del proceso de fermentación tradicional y no tradicional de la semilla de cacao Theobrama cacao del Ecotipo Acriollado, por la determinación de factores físicos - químico y microbiológicos, utilizando cuatro medios de cultivos y levadura Saccharomy cescerevisiae como iniciador de*

fermentación en el método no tradicional", mostraron que en el proceso de fermentación de ambos métodos (Tradicional y No Tradicional), obtuvieron resultados positivos en diversas fases; al determinar el crecimiento de levaduras en la primera fase, tales como *Sacchacromyces Cereviseae*, *Anseniaspora guilliermonddii,* mientras que en la segunda fase se encontraron bacterias lácticas como lo es el microorganismo *Lactobacillus fermentum* y en la tercera fase se encontraron bacterias acéticas tal como la *Gluconobacter oxydans* y señalaron que las semillas que se mantienen en un medio alcohólico junto a un desarrollo estable de las levaduras manteniendo los sólidos solubles totales a 22°Brix de cajas de plástico adoptado con el nombre de Método No Tradicional (MNT-02), obtuvo los mejore resultados en tanto análisis bromatológicos.

Mientras que Díaz & Pinargote., 2012 (11), en su estudio "*Análisis de las características organolépticas del chocolate a partir de cacao CCN-51 tratado enzimáticamente y tostado a diferentes temperaturas"*, mostraron que la adición enzimática durante la fermentación del cacao CCN-51 como la temperatura de tostado aplicada (140 °C) tuvo un efecto significativo en las características organolépticas evaluadas en el chocolate con respecto al que no fue tratado con dicha enzima, tanto que las tendencias de los perfiles sensoriales se destacó la predominancia elevada del sabor aroma floral y frutal en el tratamiento temperatura de 140 °C por 35 minutos, por lo que aseguran que a mayores temperaturas de tostado aumentan significativamente estos atributos.

CAPÍTULO III
METODOLOGÍA DE LA INVESTIGACIÓN

3.1. Localización.

La presente investigación se llevó a cabo en el Laboratorio de Rumiología y Metabolismo Nutricional (RUMEN) localizado en la Finca Experimental "La María" predios de la Universidad Técnica Estatal de Quevedo, situada en el kilómetro 7.5 de la Vía Quevedo El Empalme, Cantón Mocache, provincia de Los Ríos, cuya ubicación geográfica es de 1° 3'18" de latitud sur y 79°25' 24'' de longitud oeste, a una altura de 73 metros sobre el nivel del mar.

En la siguiente tabla se muestra las características de las condiciones agrometeorológicas del sitio experimental:

Tabla 4. *Características agrometeorológicas de la Finca Experimental "La María" UTEQ - Mocache.*

Parámetros	**Promedio**
Temperatura, °C	25.47
Humedad relativa, %	85.84
Precipitación, mm año^{-1}	2223.78
Heliofanía, horas luz año^{-1}	898.77
Evaporación, mm mes^{-1}	78.30
Zona ecológica	Bh- T
Topografía	Irregular

FUENTE: INIAP, ESTACION EXPERIMENTAL TROPICAL PICHILINGUE, 2014.
ELABORADO: AUTORA

3.2. Tipo de investigación.

La investigación es de Tipo Experimental, donde se determinó el efecto de la adición de dos musáceas como fuente de energía en la actividad microbiana durante el proceso de fermentación de almendras en híbridos experimentales de cacao. La investigación tributa a la Línea de Investigación Exploratoria: Puesto que no se ha encontrado datos sobre las unidades formadoras de colonias (UFC) de los microorganismos (Bacterias lácticas, acéticas, mohos y

levaduras) presentes en la etapa de fermentación, en las que se haya adicionado alguna fuente de energía.

3.3. Métodos de investigación.

- Mediante el método de observación se analizó las poblaciones de las bacterias y levaduras en los medios establecidos, la contaminación de las mismas, el crecimiento y cuantificación de los microorganismos producido en el proceso de fermentación.

- A través del método analítico se analizó el efecto de la adición de dos musáceas como fuente de energía, permitiendo identificar si hubo un incremento en la actividad microbiana durante el proceso de fermentación de cada uno de los tratamientos.

- El método experimental es el que nos dio la pauta, de estudiar cada una de las variables a evaluar, y se determinó los mejores tratamientos con la aplicación del análisis de varianza y las pruebas de TUKEY.

3.4. Fuentes de recopilación de información.

La información cuantitativa de las variables de respuestas se obtuvieron de la medición directa de los datos de los tratamientos (fuentes primarias de información) en los intervalos de 1, 2 y 3 días posteriores en la fermentación donde se produjo los microrganismos específicos evaluados, los resultados fueron contrastados en resultados similares y en base a literatura teórica (fuentes secundarias de información), especialmente de tesis, revistas indexadas y evidencia científica comprobable y documentada.

3.5. Diseño de la investigación.

Para el presente estudio se utilizó un Diseño Completamente al Azar (DCA), con arreglo factorial 2x4, con 8 tratamientos y 4 repeticiones. Para la comparación de las medias de los tratamientos se utilizó la prueba de Tukey ($p \leq 0.05$). Cada unidad experimental estuvo conformada por 3 cajas petri.

El modelo estadístico del diseño experimental es:

$$\boldsymbol{Y_{ij}} = \mu + \boldsymbol{\alpha_j} + \boldsymbol{\beta_k} + (\boldsymbol{\alpha\beta})_{\boldsymbol{jk}} + \varepsilon_{\boldsymbol{ijk}} \qquad \textbf{(Ecuación 1)}$$

Dónde:

$\boldsymbol{Y_{ijk}}$ = La puntuación del i sujeto bajo la combinación del *j* valor del factor *A* y el *k* valor del factor B.

μ = La media común a todos los datos del experimento

$\boldsymbol{\alpha_j}$ = El efecto o impacto del j nivel de la variable de tratamiento A.

$\boldsymbol{\beta_k}$ = Efecto del k valor de la variable de tratamiento B.

$(\boldsymbol{\alpha\beta})_{\boldsymbol{jk}}$ = Efecto de la interacción entre el j valor de A y el k valor de B.

$\varepsilon_{\boldsymbol{ijk}}$ = Error experimental o efecto aleatorio de muestreo.

El esquema del análisis se varianza se muestra en la Tabla 5.

Tabla 5. *Análisis de Varianza (ANDEVA) del diseño experimental.*

Fuente de variación (FV)	**Grados de libertad (GL)**	
Tratamiento	(ab- 1)	7
Factor A	(a -1)	1
Factor B	(b - 1)	3
Interacción A*B	(a -1) (b - 1)	3
Error experimental	ab(r - 1)	24
Total	(abr – 1)	31

ELABORADO: AUTORA

Tabla 6. *Descripción de los tratamientos.*

Tratamiento	Descripción	Rep	TUE	N.D	N.M	Total
T1	DIRCYT-258+ 30 g Puré de Banano Md.	4	3	2	3	72
T2	DIRCYT-258+ 30g Puré de Plátano Md.	4	3	2	3	72
T3	DIRCYT-259+ 30 g Puré de Banano Md.	4	3	2	3	72
T4	DIRCYT-259+ 30 g Puré de Plátano Md.	4	3	2	3	72
T5	DIRCYT-263+ 30 g Puré de Banano Md.	4	3	2	3	72
T6	DIRCYT-263+ 30 g Puré de Plátano Md.	4	3	2	3	72
T7	DIRCYT-265+ 30 g Puré de Banano Md.	4	3	2	3	72
T8	DIRCYT-265+ 30 g Puré de Plátano Md.	4	3	2	3	72
Total						**576**

*TUE=Tamaño de la Unidad Experimental – Md. = Maduro (Fruta) – N.D= Número de disoluciones – N.M= Número de microorganismos.
ELABORADO: AUTORA

3.6. Instrumentos de investigación.

Como instrumentos de investigación para resolver la formulación y sistematización del problema se analizó el efecto de las variables:

3.6.1. Variables evaluadas.

3.6.1.1. pH.

Las muestras se efectuaron a los 1, 2 y 3 días de haberse iniciado el proceso de fermentación la fermentación, cuyas lecturas se tomaron cada 24h y se las realizó a cabo con la ayuda de un potenciómetro previamente calibrado, el que permitió medir las respectivas tomas de pH.

3.6.1.2. Temperatura.

La temperatura se tomó a los 1, 2 y 3 días de haberse iniciado la fermentación, las cuales se tomaran cada 24h utilizando el potenciómetro pues este artefacto nos permitió, medir la temperatura en el centro del recipiente fermentador.

3.6.1.3. Grados Brix (ºBx).

Para la toma respectiva se procedió a muestrear durante los 1, 2 y 3 días de haberse realizado el procesos de fermentación, cuyas lecturas de sacarosa se tomaron cada 24h, con la ayuda de un refractómetro en el cual se depositó una pequeña cantidad de líquido resultante de la pulpa de la almendra, lo que permitió conocer el ºBx de los tratamientos en estudio.

3.6.1.4. Acidez titulable.

La acidez titulable de la almendra se determinó a los 1, 2 y 3 días de haberse realizado la fermentación, las lecturas se tomaron cada 24h y se lo realizo a cabo en un matraz de 250 mL, donde se colocaron 90 mL de Agua Destilada junto a 10 g de almendras de cacao previamente licuada, luego se agregaron 10 gotas de fenolftaleína, para después titular con solución de hidróxido de sodio NaOH 0.1 N.

Los resultados se expresan en porcentaje de acidez en función del ácido láctico y se calculan empleando la siguiente expresión:

$$\boldsymbol{Acidez}\ (\%) = \frac{\mathbf{a} \times \mathbf{N} \times \mathbf{meq}}{\boldsymbol{b}} \times \mathbf{100} \qquad \textbf{(Ecuación 2)}$$

Dónde:

a: volumen en mL consumido de solución de NaOH 0.1 N.

N: normalidad de la solución de NaOH.

meq: masa molar expresada en g $mmol^{-1}$. Para el ácido láctico, meq= 0.090 g $mmol^{-1}$

b: masa en gramos de la muestra

3.6.1.5. Conteo de microorganismos.

Para realizar el conteo de (BAL, BAA, Mohos y Levaduras), se utilizaron las cajas Petri que fueron incubada con el microorganismo respectivo, luego se las coloco en un contador de bacterias, donde se seleccionaron las cajas que fueron sembradas cuyas disolución poseían de 30 a 300 colonias, en este caso la disolución que tenía dicha característica fue la disolución decimal 10^{-3}.

3.6.1.6. Porcentaje de fermentación.

Esta variable se registró a través de una prueba o ensayo de corte a 100 almendras, siguiendo el procedimiento de la norma INEN 175, por cada muestra colectadas al azar, las mismas que se colocaron sobre un fondo blanco el cual permitió clasificar correctamente las características de las almendras, categorizándolas de la siguiente manera; bien fermentadas, medianamente fermentadas, violetas, pizarras y contaminadas. La fermentación total de las muestras analizadas se la expreso en porcentajes.

3.7. Procedimiento experimental.

3.7.1. Manejo del campo.

3.7.1.1. Cosecha.

Se cosecharon frutos sanos en estado fisiológico considerados como maduros, de cada hibrido se escogió 300 g de almendras de cacao o masa fresca. La cosecha se lo realizo de acuerdo a la disponibilidad de mazorcas para completar la masa fermentativa requerida.

3.7.1.2. Adición de las musáceas.

Las musáceas empleadas estarán en estado de madurez 7, las cuales fueron molidas de manera que quede una pasta o masa homogénea, luego de esto se depositó el 10% del peso de la masa

de cacao, en este caso 30 g de puré en cada una de las muestras respectivas durante el primer día de fermentación.

3.7.1.3. Fermentación.

La masa fresca se colocó en recipientes térmicos de 1 kg, y se los deposito en un micro fermentador de madera, el cuales tenía 36 divisiones y por debajo de cada división había 6 orificios en la base de aproximadamente 4 mm, de manera que se escurra filtrándose el líquido resultante de la fermentación, cada recipiente estuvo etiquetado y tapado con hojas de plátano, adicional se efectuaron remociones cada 24 horas.

3.7.1.4. Secado.

Una vez finalizado el proceso de fermentación se procedió al secado de las muestras, el cual dependió del contenido de humedad, para después proceder a la prueba de corte y determinar el grado de fermentación.

3.7.2. Manejo de laboratorio.

3.7.2.1. Preparación de medio de cultivo MRS Man Rogosa y Sharpe.

Este medio de cultivo fue para para las bacterias acido lácticas y acéticas, y se lo procedió colocando 70 g del medio en un litro de agua destilada, se mezcla con agitador luego de esto se lo coloca en el calentador agitador, hasta que llegue a punto de ebullición durante un lapso de 15 ó 20 minutos, hasta que se verifique la prueba de solidificación, una vez terminado se esterilizar en autoclave durante 15 minutos a 121 ºC.

3.7.2.2. Preparación de medio de cultivo Glucosa Sabouraud Agar.

Este medio de cultivo fue para determinar mohos y levaduras y se lo realizo preparando 70 g de polvo por cada 1000 mL de agua destilada, se mezcla con agitador luego de esto se lo coloca en el calentador agitador de manera que se vaya agitando frecuentemente, hasta que llegue a punto de ebullición durante un lapso de 15 ó 20 minutos, hasta que se verifique la prueba de solidificación, una vez terminado se esterilizar en autoclave durante 15 minutos a 121 ºC.

Se muestra en la siguiente tabla 7, las características de medios de cultivos de los microorganismos a evaluar:

Tabla 7. *Características de medios de cultivos de los microorganismos.*

Microorganismos	**Medios**	**Temperatura de Incubación (ºC)**	**Tiempo de Incubación (días)**
Bacterias lácticas	MRS	30 – 50 En anaerobiosis	2 a 3
Bacterias acéticas	MRS	35-37 En aerobiosis	2 a 3
Mohos y Levaduras	Sabouraud	29 En aerobiosis	5 a 7

ELABORADO: AUTORA

3.7.2.3. Preparación de la peptona como medio diluyente.

Se disolvió 4.6 g de peptona en 4600 mL de agua destilada en un quitazato, se lo coloco en el agitador por 10 minutos hasta que se haya disuelto completamente, luego de esto se llevó a autoclave por 20 minutos, a 121 ºC.

3.7.2.4. Recolección de muestras de microorganismos del proceso fermentativo de cacao.

Para la recolección de los microorganismos se pesaron 10 g de almendras de cada muestra y se colocó en matraces 200 mL de agua peptonada, se agito de manera que se desprenda los microorganismos del arilo de la semilla y se pipeteó 1000 µl de cada una de las mezclas en fermentación, luego de esto se procedió a realizar las disolución decimales en los tubos, este proceso se lo realizo cada 24 horas de haber iniciado el proceso fermentativo de cacao.

3.7.2.5. Incubación de los microorganismos

Una vez que se recolectó las muestras, se prepararon diluciones decimales de 10^{-2} y 10^{-3} con agua peptonada como medio diluyente, se pipeteó 50 µl de los tubos que contenían las muestras, luego se depositaron en las cajas Petri que estaban rotuladas correctamente las cuales tenían los medios respectivos para cada uno de los microorganismos y se dejaron a temperatura ideal de modo que con el pasar de los días comience la propagación de las bacterias lácticas, acéticas, mohos y levaduras.

3.8. Tratamiento de los datos.

El análisis estadístico se realizó mediante el análisis de varianza (ANDEVA) y los promedios fueron comparados mediante la prueba de Tukey ($P \leq 0.05$), con la utilización de un software libre. Cuadros, figuras y el procesamiento de los datos se realizará en hojas de cálculo de EXCEL del paquete Office de Microsoft.

3.9. Recursos humanos.

Talento humano que contribuyo en la realización del presente proyecto de investigación es el que a continuación se nombra:

- Director del proyecto de investigación Ing. M.Sc. Jorge Quintana Zamora.

- Encargado del Laboratorio de Rumiología y Metabolismo Animal, Ing. David Zapatier.

- Docentes de la Facultad de Ciencias Pecuarias, Ing. Jaime Vera e Ing. Bolívar Montenegro.

- Estudiante y autora del Proyecto de Investigación Gina Rivera Benites.

3.10. Materiales.

Para la presente investigación se utilizó los siguientes materiales.

3.10.1. Material genético.

Se utilizaron 4 híbridos de orígenes Trinitario (Madre) y Nacional (Padre), con una edad establecida de tres años en el campo, referenciados por ser materiales productivos, provenientes de la Finca La Represa, predios de la Universidad Técnica Estatal de Quevedo.

3.10.2. Musáceas

También se utilizaron 2 tipos de musáceas:

- Banano Gros Michel (*Musa acuminata* AAA)
- Plátano Dominico (*Musa* AAB Simmonds),

3.10.3. Equipos.

- Estufa de Cultivo
- Cabina de Bioseguridad Tipo II
- Autoclave.
- Balanza digital
- Balanza Analítica

- Calentador Agitador
- Desecador
- Destilador de Agua
- Potenciómetro
- Refractómetro
- Termómetro

3.10.4. Materiales de vidrio

- Vasos de Precipitación
- Cajas Petri
- Tubos de Ensayo
- Matraz Erlenmeyer de 500 y 1000 mL
- Frascos de Vidrio
- Varilla de Agitación
- Embudo de Porcelana
- Tubos Digestores
- Bureta
- Pipetas de morh de 10.0 mL

3.10.5. Otros materiales

- Asa de Inoculación
- Sacabocado de 4 mm
- Mechero
- Agitador Magnético
- Alcohol 96°
- Cloro
- Gasa y Algodón
- Papel Parafilm y Papel Filtro
- Marcador Permanente
- Cintas adhesiva

- Papel de Aluminio
- Baldes
- Recipiente de Aluminio
- Agua Destilada
- Micro fermentadores de madera
- Machete
- Tijera

3.10.6. Reactivos

- Buffer 4, 7, 10
- Cloruro de Sodio
- MRS
- Sabouraud glucosada agar
- Fenolftaleína
- Peptona

CAPÍTULO IV
RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Resultados y discusión.

4.1.1. Conteo microbiano.

En este capítulo se mostrará los resultados del presente estudio referentes al conteo microbiológico, cabe recalcar que los datos fueron tomados de la disolución 10^{-3}, pues esta presentaba las poblaciones de 30 – 300 unidades formadoras de colonia (UFC) durante el proceso de fermentación de cacao.

4.1.1.1. Levaduras.

Con respecto a levaduras, se indica el efecto del factor (A) Musáceas durante el proceso de fermentación en híbridos de cacao.

Tabla 8. *Efecto de las musáceas durante el proceso de fermentación en híbridos de cacao (Theobroma cacao* L.*) sobre levaduras.*

Tiempo de fermentación	Levaduras		
	Puré de banano	Puré de plátano	p<
24 horas	5.9 x 10^6 a	5.5 x 10^6 a	0.1146 NS
48 horas	2.3 x 10^6 a	2.0 x 10^6 a	0.5146 NS
72 horas	2.6 x 10^6 a	1.7 x 10^6 a	0.1022 NS

Promedios con letras iguales no difieren estadísticamente, según Tukey ($p<0.05$); NS = No significativo; * = Significativo; ** = Altamente significativo.

En la tabla 8, se observa que no existió significancia estadística en las musáceas sobre la población de levaduras, por lo que el puré de banano como de plátano no generó efecto alguno en el conteo microbiano, no obstante al pasar el tiempo de fermentación las levaduras obtienen un decrecimiento de unidades formadoras de colonias.

En otro ámbito Assumpção *et al* (58) demuestran en la literatura que la fermentación del kéfir azucarado posee una asociación microbiana, indicando que las levaduras son un grupo extremadamente diverso con relación a los sustratos de azúcar en que se desarrollan, lo que indica que su metabolismo depende del carbono y la disponibilidad de fuentes de energía durante la fermentación del grano. Así mismo Ikram & Ali (59) señalan que el alto contenido

en sacarosa de las matrices azucaradas probablemente estimula el crecimiento de las especies de Saccharomyces, que son capaces de convertir la sacarosa en glucosa y fructosa por la enzima invertasa, de manera que las células de levadura tienen glucosa como metabolito libre.

Por otro lado Bajwa & Mittal (60), observaron que al añadir pulpa de mango sin azúcar en la leche se registró un recuento de placa estándar más elevado, debido a la presencia de sacarosa de la pulpa, este crecimiento fue más evidente en el control debido al alto recuento inicial detectando levaduras al segundo día de almacenamiento, aumentando la población durante el almacenamiento.

En cambio Tarakçi & Küçüköner (61) indican que añadiendo sabores de frutas al yogurt obtienen aumentos significativos en el conteo de levaduras, pues estas variaban de 2.10 a 2.89 CFU g^{-1} y al principio el yogur que contenía melaza de uva poseían menor número de levaduras y estos aumentaron progresivamente durante el almacenamiento.

En la siguiente tabla, se detalla el efecto de los híbridos (Factor B) durante el proceso de fermentación en híbridos de cacao (*Theobroma cacao* L.) sobre levaduras.

Tabla 9. Efecto de los híbridos durante el proceso de fermentación en almendras de cacao (Theobroma cacao L.) *sobre levaduras.*

Tiempo de fermentación	Levaduras				p<
	Hibrido DIRCYT 258	Hibrido DIRCYT 259	Hibrido DIRCYT 263	Hibrido DIRCYT 265	
24 horas	5.7 x 10^6 a	5.2 x 10^6 a	5.8 x 10^6 a	5.9 x 10^6 a	0.1938 NS
48 horas	2.1 x 10^6 ab	8.9 x 10^5 b	2.0 x 10^6 ab	3.5 x 10^6 a	0.0040 *
72 horas	3.2 x 10^6 a	1.4 x 10^5 a	2.0 x 10^6 a	2.1 x 10^6 a	0.2002 NS

Promedios con letras iguales no difieren estadísticamente, según Tukey ($p<0.05$); NS = No significativo; * = Significativo; ** = Altamente significativo.

La presente tabla indica que existió significancia estadística ($p<0.05$) en los híbridos durante las 48 horas de haber iniciado el proceso de fermentación de cacao, pues el material vegetativo

DIRCYT – 265 fue el que obtuvo el mayor recuento de unidades formadoras de colonias UFC $g^{.1}$ en comparación con el resto de híbridos evaluados.

Estos resultados son similares a los descritos por Da Veiga *et al* (62) quienes revelan que la población de levaduras en las fermentaciones híbridas de cacao como la de su material PH 15 (Porto Hibrido) aumentan ligeramente durante las primeras 36 h de fermentación y después de este período las poblaciones disminuyen a valores como de 1.69 log UFC mL^{-1}, además estos mismos autores indican que la levadura *Saccharomyces cerevisiae* fue la que predominó en todas las fermentaciones de sus híbridos, seguida por *Hanseniaspora uvarum* y el género *Pichia.*

Así mismo Nielsen *et al* (47) reportaron que a las 36 - 38 horas de fermentación de caco dominan especies de levaduras como *Saccharomyces cerevisiae* y *Pichia membranaefaciens*, y que al final de la fermentación realizados en charolas se encuentran especies como *Candida krusei* y *Hanseniaspora guilliermondi*. De igual forma Pereira *et al* (63) informaron que *Saccharomyces cerevisiae* alcanzó el máximo de poblaciones de 10^7 UFC g^{-1} a las 24 h de haber iniciado el proceso de fermentación de cacao realizados en una caja, después de lo cual fue eclipsado por una serie de especie, como *Pichia kudriavzevi*.

En la tabla 10, se muestra los resultados de la interacción de los tratamiento de la población de levaduras evaluadas durante el proceso de fermentación de cacao, las cuales presentaron significancia estadística ($p<0.05$) solo a partir de las 48h de haber iniciado el proceso. Es en este determinado tiempo de 48h donde se refleja un bajo recuento de levaduras, a excepto del T7 (D265 + 30g PB) quien se mantuvo a ritmo durante ese periodo de tiempo, ya que al empezar las 72h el comportamiento del resto de híbridos obtienen una mínima creciente de levaduras.

Sin embargo cabe recalcar que en el inicio de la fermentación (24h) el número de unidades formadora de colonias de levaduras fue alto pues las poblaciones de los tratamientos se mantenían equitativamente, esto valores obtenidos durante este tiempo no se asemejan a los descritos por Ardhana & Fleet y Schwan (48,64) quienes señalan que al principio de la fase

inicial de fermentación los conteos de levadura son de aproximadamente 10^4 - 10^5 UFC g^{-1} debido al alto contenido de azúcar y el pH bajo de la pulpa pues el nivel de oxígeno limitado favorecen la proliferación de levaduras, además estos mismos autores indican que sus poblaciones pueden llegar hasta máximas de 10^6 - 10^8 UFC g^{-1} durante las próximas 48-72 horas pues después de este tiempo, disminuyen constantemente hasta el final del proceso.

Así mismo Pereira *et al* (63) indicaron que la población de levaduras provenientes de materiales de cacao estado de Bahía, Brasil disminuyeron progresivamente en número y se vuelven indetectables después de 72 y 108 horas en las fermentaciones realizados en recipientes plásticos (PC) y de acero inoxidable (ST) respectivamente.

Tabla 10. *Conteo de microorganismos (UFC g^{-1}) del proceso de fermentación en híbridos de cacao (Theobroma cacao L.) mediante la adición de musáceas sobre levaduras.*

	LEVADURAS								p<		
T.F	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8	A	B	A x B
24 h	5.9×10^6 a	5.6×10^6 a	5.9×10^6 a	4.6×10^6 a	5.9×10^6 a	5.7×10^6 a	5.8×10^6 a	6.0×10^6 a	0.1146 NS	0.1938 NS	0.1851 NS
48 h	1.2×10^6 b	3.1×10^6 ab	4.6×10^5 b	1.3×10^6 b	2.6×10^6 ab	1.4×10^6 b	4.9×10^6 a	2.1×10^6 ab	0.5146 NS	0.0040*	0.0060*
72 h	3.9×10^6 a	2.5×10^6 a	1.9×10^6 a	9.5×10^5 a	2.6×10^6 a	1.5×10^6 a	2.1×10^6 a	1.8×10^6 a	0.1022 NS	0.2002 NS	0.9220 NS

T.F = Tiempo de fermentación; h = Horas; T1 = hibrido de cacao DIRCYT-258 + 30g de puré de banano; T2 = hibrido de cacao DIRCYT-258 + 30g de puré de plátano; T3 = hibrido de cacao DIRCYT-259 + 30g de puré de banano; T4 = hibrido de cacao DIRCYT-259 + 30g de puré de plátano; T5 = hibrido de cacao DIRCYT-263 + 30g de puré de banano; T6 = hibrido de cacao DIRCYT-263 + 30g de puré de plátano; T7 = hibrido de cacao DIRCYT-265 + 30g de puré de banano; T8 = hibrido de cacao DIRCYT-265 + 30g de puré de plátano; A = factor A (2 tipos musáceas banano y plátano); B = factor B (4 híbridos de cacao); A x B = interacción factor A (2 tipos musáceas banano y plátano); B = factor B (4 híbridos de cacao); [1/] = Promedios con letras iguales no difieren estadísticamente, según Tukey ($p<0.05$); NS = No significativo; * = Significativo; ** = Altamente significativo.

4.1.1.2. Bacterias ácido lácticas (BAL).

En la tabla 11 se indica el efecto de las musáceas (Factor A) durante los tres tiempos evaluados (24, 48 y 72 horas) durante el proceso de fermentación en híbridos de cacao (*Theobroma cacao* L.) sobre bacterias ácido lácticas.

Tabla 11. *Efecto de las musáceas durante el proceso de fermentación en híbridos de cacao (Theobroma cacao* L.*) sobre bacterias ácido lácticas.*

Tiempo de fermentación	Levaduras		
	Puré de banano	Puré de plátano	p<
24 horas	5.6 x 10^6 a	5.5 x 10^6 a	0.8690 NS
48 horas	3.6 x 10^6 a	3.9 x 10^6 a	0.6869 NS
72 horas	5.0 x 10^6 a	4.5 x 10^6 a	0.2989 NS

Promedios con letras iguales no difieren estadísticamente, según Tukey (p<0.05); NS = No significativo; * = Significativo; ** = Altamente significativo.

Se puede observar que no existió significancia estadística en las musáceas sobre la población de bacterias ácido lácticas, ya que el puré de banano y plátano no generó efecto alguno en el conteo microbiano, sin embargo durante las 48h posteriores al proceso de fermentación se produjo una disminución en el recuento, para luego alcanzar el mismo nivel con el que se inició.

Sin embargo los resultados no concuerdan con Nielsen *et al* (47), quienes indican que debido al agotamiento de las fuentes de energía y a una concentración creciente de etanol y temperatura, los números de LAB disminuyen durante etapas posteriores del proceso de fermentación del grano de cacao.

En cambio Assumpção *et al* (58) indican que en relación con la composición de las bacterias del kéfir de granos azucarado, se observa una diversidad más estable al comparar ambos sustratos (leche y las matrices azucaradas), determinando que existe un una fuerte dominancia del grupo *Lactobacillus.*

No obstante Alcântara *et al* (65) indican que al adicionar miel de abeja en el yogur de cabra obtienen recuentos altos del grupo de bacterias iniciadoras (LAB) en el primer día de almacenamiento con valores de aproximadamente 8.5 Log UFC mL^{-1}, disminuyendo a 7.5 y 7.2 Log UFC mL^{-1} en los días 14 y 21 días de almacenamiento, además estos mismos autores señalan que a adición de miel de abeja sin aguijón en los yogures parecía asegurar el mantenimiento de recuentos mayores en comparación con la formulación sin miel añadida con el tiempo promoviendo la población de *L. acidophilus.*

En cambio Magalhães *et al* (66) muestran que el metabolismo de la levadura favorece el crecimiento de ácido úrico, LAB y BAA, pues la hidrólisis de sacarosa por la invertasa de levadura da como resultado un aumento de los niveles de glucosa y fructosa, haciendo que esta fuente de carbono esté disponible para las bacterias ácido lácticas.

En la siguiente tabla, se detalla el efecto de los híbridos (Factor B) durante el proceso de fermentación en híbridos de cacao (*Theobroma cacao* L.) *bacterias ácido lácticas*.

Tabla 12. *Efecto de los híbridos durante el proceso de fermentación en almendras de cacao (Theobroma cacao L.) sobre bacterias ácido lácticas.*

Tiempo de fermentación	Levaduras				p<
	Hibrido DIRCYT 258	Hibrido DIRCYT 259	Hibrido DIRCYT 263	Hibrido DIRCYT 265	
24 horas	5.3×10^6 a	5.2×10^6 a	5.9×10^6 a	5.7×10^6 a	0.3428 NS
48 horas	4.6×10^6 a	3.7×10^6 a	4.4×10^6 a	2.4×10^6 a	0.0613 NS
72 horas	4.9×10^6 a	4.6×10^6 a	4.5×10^6 a	4.4×10^6 a	0.8664 NS

Promedios con letras iguales no difieren estadísticamente, según Tukey ($p<0.05$); NS = No significativo; * = Significativo; ** = Altamente significativo.

La presente tabla indica que no existió significancia estadística ($p>0.05$) en los híbridos durante el proceso de fermentación de cacao (24, 48 y 72 horas), pues se refleja que los materiales vegetativo poseen el mismo recuento microbiano UFC g^{-1}, a excepción del

DIRCYT – 265 quien disminuyo un poco las unidades formadoras de colonias en las 48 horas en comparación con el resto de híbridos evaluados.

En la fase inicial se observa que los datos de los materiales arrancan con alto recuento microbiano y concuerda con Da Veiga *et al* (62) quienes observaron diferencias en las poblaciones del grupo bacterias ácido lácticas en todos los experimentos de fermentación encontrando el recuento inicial más alto para el PH híbrido 15 con un valor de 3.30 log CFU mL^{-1}.

A partir de las 72h los híbridos los datos muestran una población idéntica de bacterias ácido lácticas, los cuales no se asemejan a los descrito por Almicar & Morales (54) quienes muestran que al realizar mezclas de cacao criollo, trinitario y forastero se obtiene un recuento bajo de bacterias lácticas durante las 72h de haber iniciado la fermentación de las almendras.

Por otro lado Nielsen *et al* (47) señalaron que al realizar fermentaciones de cacao en forma de montón tradicional observaron que las bacterias ácido lácticas se hicieron dominantes después de 12 - 24h de fermentación y permanecieron predominantes a lo largo de las fermentaciones, además estos mismos autores indican que *Lactobacillus fermentum* fue la bacteria dominante en la mayoría de las muestras y que durante las fermentaciones se detectaron varios otros BAL incluyendo *Lactobacillus plantarum, Leuconostoc pseudomesenteroides, Leuconostoc pseudoficulneum*, *Pediococococcus acidilactici* y una especie de BAL presumiblemente no descrita.

En la tabla 13 se muestra la interacción de los tratamiento donde se observa que el número de unidades formadoras de colonias (UFC g^{-1}) de bacterias ácido lácticas resultantes, no presentó significancia estadística ($p>0.05$) durante el proceso de fermentación de cacao (24, 48 y 72h), sin embargo en la primera etapa de 24h el recuento de bacterias es similar entre tratamientos, pero después de este lapso de tiempo los tratamientos 3,6, 7 y 8 generaron un decrecimiento en su población inicial durante las 48 horas, no concordando con lo dicho por Wacher (6) quien indica que a partir de la segunda fase del proceso de fermentación de cacao (48h) se favorece el desarrollo de bacterias lácticas las cuales fermentan los carbohidratos residuales y continúan el consumo del ácido cítrico.

Alrededor de las 72h la población se mantiene con un recuento alto de bacterias ácido lácticas por lo que estos datos se asemejan a los descritos por Ardhana & Fleet; Camu *et al*; Nielsen *et al*; Shwan *et al* (48,67,47,68) quienes señalan que el crecimiento de las bacterias del ácido láctico generalmente no comienza hasta después de 24 - 48 h pues su población máxima de 10^7 - 10^9 CFU g^{-1} se desarrolla aproximadamente a partir de las 72 h de haber iniciado la fermentación, ya que poco después de este tiempo ocurre una disminución.

No obstante Da Veiga *et al* (62) observaron que existen diferencias en las poblaciones del grupo de bacterias lácticas en todas las fermentaciones realizadas a 3 híbridos experimentales, donde indica que el recuento inicial más alto se encontró para híbrido PH 15 (3.30 log CFU mL^{-1}). En cambio Prado (55) determinó diferentes microorganismos hallados durante cada uno de los días de fermentación de cacao nacional, encontrando durante el día cero de fermentación producción de benzeetanol (para el caso de las lácticas) como fue el *Lactobacillius nagelii.*

Así mismo Pereira *et al* (69) indicaron que tanto géneros de *Lactobacillus plantarum* como *Lactobacillus fermentum* dominan la fermentación de cacao, siendo *L. plantarum* el más frecuente en las primeras etapas y *L. fermentum* predominando en las etapas posteriores

Tabla 13. *Conteo de bacterias ácidos lácticas (UFC g^{-1}) del proceso de fermentación en híbridos de cacao (Theobroma cacao L.) mediante la adición de musáceas.*

	Bacterias ácido lácticas								p<		
T.F	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8	A	B	A x B
24 h	5.4 x 10^6 a	5.2 x 10^6 a	5.6 x 10^6 a	4.8 x 10^6 a	5.8 x 10^6 a	6.0 x 10^6 a	5.5 x 10^6 a	6.0 x 10^6 a	0.8690 NS	0.3428 NS	0.5146 NS
48 h	4.0 x 10^6 a	5.2 x 10^6 a	2.7 x 10^6 a	4.6 x 10^6 a	5.5 x 10^6 a	3.3 x 10^6 a	2.4 x 10^6 a	2.5 x 10^6 a	0.6869 NS	0.0613 NS	0.1079 NS
72 h	4.0 x 10^6 a	5.9 x 10^6 a	5.1 x 10^6 a	3.9 x 10^6 a	5.0 x 10^6 a	3.7 x 10^6 a	5.3 x 10^6 a	3.4 x 10^6 a	0.2365 NS	0.8664 NS	0.0729 NS

T.F = Tiempo de fermentación; ; h = Horas; T1 = hibrido de cacao DIRCYT-258 + 30g de puré de banano; T2 = hibrido de cacao DIRCYT-258 + 30g de puré de plátano; T3 = hibrido de cacao DIRCYT-259 + 30g de puré de banano; T4 = hibrido de cacao DIRCYT-259 + 30g de puré de plátano; T5 = hibrido de cacao DIRCYT-263 + 30g de puré de banano; T6 = hibrido de cacao DIRCYT-263 + 30g de puré de plátano; T7 = hibrido de cacao DIRCYT-265 + 30g de puré de banano; T8 = hibrido de cacao DIRCYT-265 + 30g de puré de plátano; A = factor A (2 tipos musáceas banano y plátano); B = factor B (4 híbridos de cacao); A x B = interacción factor A (2 tipos musáceas banano y plátano); B = factor B (4 híbridos de cacao); 1/ = Promedios con letras iguales no difieren estadísticamente, según Tukey ($p<0.05$); NS = No significativo; * = Significativo; ** = Altamente significativo.

.

4.1.1.3. Bacterias ácidos acéticas (BAA).

A continuación se muestra en la tabla 14, el efecto de las musáceas (Factor A) durante los tres tiempos evaluados (24, 48 y 72 horas) durante el proceso de fermentación en híbridos de cacao (*Theobroma cacao* L.) sobre bacterias ácido acéticas.

Tabla 14. *Efecto de las musáceas durante el proceso de fermentación en híbridos de cacao (Theobroma cacao* L.*) bacterias ácido acéticas.*

Tiempo de fermentación	Levaduras		
	Puré de banano	Puré de plátano	p<
24 horas	5.6 x 10^6 a	5.2 x 10^6 a	0.0933 NS
48 horas	3.7 x 10^6 a	4.5 x 10^6 a	0.2112 NS
72 horas	5.0 x 10^6 a	4.5 x 10^6 a	0.2989 NS

Promedios con letras iguales no difieren estadísticamente, según Tukey (p<0.05); NS = No significativo; * = Significativo; ** = Altamente significativo.

Se puede observar en la tabla que no existió significancia estadística en las musáceas sobre la población de bacterias ácido acéticas, pues el puré de banano como de plátano no generó efecto alguno en el conteo microbiano UFC g^{-1}, sin embargo durante las 48h posteriores al proceso de fermentación se produjo una disminución en el recuento, para luego alcanzar un nivel parecido con el que se inició.

No obstante durante las primeras 24 horas de fermentación el recuento inicial es alto por lo que estos valores se asemeja a lo descrito por Pereira *et al* (63) los cuales indicaron que la población de bacterias ácido acéticas (BAA) comenzó a desarrollarse después de 12h llegando a 5.20 y 6.36 log UFC g^{-1} en recipientes plásticos (PC) y de acero inoxidable (ST) y que estas bacterias estuvieron presente hasta 96 h después de la fermentación de cacao.

Del mismo modo Afoakwa *et al* (70) indica que durante la fermentación, el etanol y el ácido acético se difunden en las almendras y, combinados con el aumento de la temperatura, matan el embrión de la semilla por lo que se descompone la estructura interna del grano de cacao, liberando compuestos y pigmentos que interactúan bioquímicamente con hidrolasas endógenas activadas para desarrollar precursores de sabor y color.

Por otra parte Almicar & Morales (54) señalan que al realizar mezclas de cacao criollo y forastero se obtiene un recuento alto de bacterias ácidos acéticas durante las 96 y 120h de haber iniciado la fermentación debido a la formación de una mayor cantidad de ácido acético.

Sin embargo Assumpção *et al* (58) indican que durante la fermentación de granos kéfir azucarado, es posible observar una mayor presencia de especies AAB en relación a la leche, esto indica que el metabolismo de AAB es estimulado en matrices azucaradas que utilizan el etanol producido por la levadura para su crecimiento y el metabolismo del ácido acético.

Así Magalhães *et al* (66) señalaron que parte del contenido de etanol producido en la fermentación por la acción de levadura está disponible para el metabolismo de las bacterias ácido acéticas (AAB).

Además Schwan & Wheals (71)muestran que la composición de la pulpa es un factor que interfiere directamente en la selección de la microflora fermentativa, teniendo en vista que la proporción de azúcares varía en función de la edad del fruto.

En la siguiente tabla, se detalla el efecto de los híbridos (Factor B) durante el proceso de fermentación en híbridos de cacao (*Theobroma cacao* L.) sobre bacterias ácido acéticas.

Tabla 15. *Efecto de los híbridos durante el proceso de fermentación en almendras de cacao (Theobroma cacao L.) sobre bacterias ácido acéticas*.

Tiempo de fermentación	Bacterias ácido acéticas				p<
	Hibrido DIRCYT 258	Hibrido DIRCYT 259	Hibrido DIRCYT 263	Hibrido DIRCYT 265	
24 horas	5.6×10^6 a	5.3×10^6 a	5.0×10^6 a	5.8×10^6 a	0.1193 NS
48 horas	4.6×10^6 a	3.4×10^6 a	4.8×10^6 a	4.6×10^6 a	0.4048 NS
72 horas	5.3×10^6 a	4.9×10^6 a	4.5×10^6 a	4.3×10^6 a	0.4677 NS

Promedios con letras iguales no difieren estadísticamente, según Tukey ($p<0.05$); NS = No significativo; * = Significativo; ** = Altamente significativo.

La presente tabla indica que no existió significancia estadística ($p>0.05$) en los híbridos durante el proceso de fermentación de cacao (24, 48 y 72 horas), pues se refleja que los

materiales vegetativo poseen el mismo recuento microbiano UFC g^{-1}, es así que durante las 24 horas el número de unidades formadoras de colonias poseen una población alta de bacterias y a partir de las 48h posteriores a esta disminuyeron ligeramente.

Por otro lado Da Veiga *et al* (62) observaron diferencias en las poblaciones del grupo bacterias ácido acéticas en sus híbridos evaluados en el que al inicio de la fermentación de cacao tienen un bajo recuento de PH 9 3.46 log CFU mL^{-1} y al pasar las 36 horas aumentan a 5.97 log CFU mL^{-1}, poco después las BAA disminuyeron hasta el final de la fermentación.

En cambio Camu *et al*; Lefeber *et al*; Papalexandratou *et al* (72,73,74) indican que durante las 48 - 112 horas las bacterias ácido acéticas son dominantes en este periodo, siendo las especies *Acetobacter ghanensis* y *Acetobacter senegalensis*, las que se presentan en el inicio del proceso de fermentación del grano de cacao, producidas en fase aeróbica creada por el drenaje mejorado de la pulpa y la entrada de aire en la fermentación.

Además Nielsen *et al* (47) señalaron que durante las 12 - 24h de fermentación las bacterias ácido acéticas alcanzan altos recuentos en la fase media de fermentación y estos mismos autores indican que *Bacillus spp., Acetobacter syzygii, Acetobacter pasteurianus y Acetobacter tropicalis* se encuentran predominando en las fermentaciones investigadas sobre cacao.

En la tabla 16, se muestra la población de bacterias ácidos acéticas evaluadas presentaron significancia estadística ($p<0.05$) con respecto a la interacción entre los factores híbridos y musáceas durante las primeras 24h de fermentación realizadas en cacao, ya que los tratamientos 2, 3 y 8 mostraron valores altos en recuentos microbianos, en comparación con el resto de materiales.

Sin embargo durante la segunda fase de fermentación ocurrido en las 48h posteriores, la población de bacterias alcanza una leve disminución en el recuento de BAA, pero en las siguiente 72h estos valores aumentan coincidiendo con Nielsen *et al* (47) quienes señalan que la intervención de las bacterias acéticas indican el inicio de la tercera fase del proceso de

fermentación (72h), pues estas bacterias transforman el etanol en ácido acético, generando una reacción exotérmica.

De igual manera los valores del incremento de unidades formadoras de colonias UFC g^{-1} de bacterias ácido acéticas de las 72h de fermentación obtenidos en este ensayo, se asemejan a los descritos por Camu *et al*; Ardhana & Fleet; Nielsen *et al;* Galvez *et al* (75,48,47,76) quienes revelan que las bacterias del ácido acético generalmente se vuelven significativas en la fermentación después de 48 - 72H cuando alcanzan su población más alta de 10^6 - 10^8 UFC g^{-1} ya que en ese momento la masa de la almendra tiene mayor acceso al oxígeno y hay considerable etanol presente en la masa que se ha originado a partir del crecimiento de la levadura.

Además Schwan & Wheals (71) señalan que dentro del proceso de fermentación de cacao, las bacterias ácido acéticas (BAA), en particular el género *A. pasteurianus*, son capaces de crecer en etanol, manitol y lactato convirtiendo el etanol en ácido acético siendo las responsables del aumento de temperatura dentro de la masa de cacao en fermentación.

Tabla 16. *Conteo de bacterias ácidos acéticas (UFC g^{-1}) del proceso de fermentación en híbridos de cacao (Theobroma cacao L.) mediante la adición de musáceas.*

	Bacterias ácido acéticas								p<		
T.F	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8	A	B	A x B
24 h	5.3 x 10^6 ab	6.0 x 10^6 a	5.9 x 10^6 a	4.8 x 10^6 ab	5.8 x 10^6 ab	4.2 x 10^6b	5.6 x 10^6 ab	6.0 x 10^6 a	0.0933 NS	0.1193 NS	0.0091 *
48 h	4.6x 10^6 a	4.7 x 10^6 a	2.4 x 10^6 a	4.3 x 10^6 a	5.1 x 10^6 a	4.5 x 10^6 a	2.4 x 10^6 a	4.8 x 10^6 a	0.2112 NS	0.4048 NS	0.4040NS
72 h	4.8 x 10^6 a	5.9 x 10^6 a	5.2 x 10^6 a	4.7 x 10^6 a	4.5 x 10^6 a	4.6 x 10^6 a	5.6 x 10^6 a	2.9 x 10^6 a	0.2989 NS	0.4677 NS	0.0695NS

T.F = Tiempo de fermentación; ; h = Horas; T1 = hibrido de cacao DIRCYT-258 + 30g de puré de banano; T2 = hibrido de cacao DIRCYT-258 + 30g de puré de plátano; T3 = hibrido de cacao DIRCYT-259 + 30g de puré de banano; T4 = hibrido de cacao DIRCYT-259 + 30g de puré de plátano; T5 = hibrido de cacao DIRCYT-263 + 30g de puré de banano; T6 = hibrido de cacao DIRCYT-263 + 30g de puré de plátano; T7 = hibrido de cacao DIRCYT-265 + 30g de puré de banano; T8 = hibrido de cacao DIRCYT-265 + 30g de puré de plátano; A = factor A (2 tipos musáceas banano y plátano); B = factor B (4 híbridos de cacao); A x B = interacción factor A (2 tipos musáceas banano y plátano); B = factor B (4 híbridos de cacao); 1/ = Promedios con letras iguales no difieren estadísticamente, según Tukey ($p<0.05$); NS = No significativo; * = Significativo; ** = Altamente significativo.

4.1.2. Análisis físicos- químicos de la fermentación.

Se realizó un análisis previo de las características físicas y químicas de las musáceas e híbridos de cacao, antes de iniciarse con el proceso de fermentación, la tabla con cuyos valores se describen en los resultados de las variables se encontrará ubicada en los anexos.

4.1.2.1. pH.

En la tabla 17, el efecto de las musáceas (Factor A) durante los tres tiempos evaluados (24, 48 y 72 horas) durante el proceso de fermentación en híbridos de cacao sobre el pH.

Tabla 17. *Efecto de las musáceas durante el proceso de fermentación en híbridos de cacao (Theobroma cacao* L.*) sobre el pH.*

Tiempo de fermentación	Puré de banano	Puré de plátano	p<
24 horas	3.77 b	4.13 a	0.0001 **
48 horas	4.10 a	4.19 a	0.2480 NS
72 horas	4.04 a	3.88 a	0.0534 NS

Promedios con letras iguales no difieren estadísticamente, según Tukey (p<0.05); NS = No significativo; * = Significativo; ** = Altamente significativo.

Se puede observar que existió alta significancia estadística (p<.0001) en las musáceas durante las primeras 24h sobre el pH en la fermentación de cacao, pues durante este tiempo el puré de banano obtuvo el menor nivel de potencial de hidrogeno con una diferencia de 0.36 en comparación con el del puré de plátano, sin embargo cabe recalcar que antes de iniciar el proceso de fermentación los valores de pH de los purés fueron de 4.65 en el del banano y 4.42 para el de plátano, así durante las 48h posteriores al proceso de fermentación el puré de ambas musáceas aumentaron ligeramente y ya en las 72h el nivel de pH disminuyo levemente. Estas variaciones existentes de pH en las musáceas, se debe

Estas pequeñas variaciones se pudieron haber producido por el contenido de solidos soluble totales de las musáceas ya que el puré de plátano poseía un grado de 36% (ºBx), además cabe destacar que Schwan y Wheals; Afoakwa *et al* y Lima *et al* (71,77,78) indican la importancia

en destacar que el aumento de las concentraciones de ácido acético y la disminución concomitante del pH del cotiledón que van desde 6.3 – 7.0 hasta 4.0 – 5.5 destruyen las membranas internas de los compartimentos de cotiledón de frijol.

Además Dormond *et al* (79) indicaron que la cáscara de banano maduro utilizado como material de ensilaje en combinación con pasto King Grass *(Pennisetum purpureum)* obtuvieron los efluentes de las mezclas con valor de pH del orden de 5 y a medida que avanza el proceso fermentativo, los efluentes mostraron un valor de pH del orden de 3.

Por otro lado según Barrera *et al* (80) indica que durante la maduración del plátano Dominico-Hartón obtiene diferencias significativas en el pH a partir de la segunda etapa de su maduración demostrando que el plátano posee valores más altos de pH. Así mismo De Souza *et al* (81) consideran que este cambio en el ph puede estar relacionado con la degradación de almidón en azúcares reductores o su conversión en ácido pirúvico provocado por la respiración de las frutas.

No obstante Bajwa & Mittal (60) adicionando pulpa de mango encontró que el pH de los yogures evaluados con esta fruta disminuyó de 4.15 a 3.90 durante los primeros días, esta disminución del pH estuvo acompañada de un aumento del aroma alcohólico y sabor ácido del yogur.

Pero Engu *et al* (82) revelaron que la variación de los valores de pH de los yogures con adición de pulpa de cereza durante el almacenamiento muestra un decrecimiento del nivel de pH con las cerezas agregadas, explicando que estos cambio son producidos por la actividad microbiana resultantes en los yogures de fruta agregada.

En cambio Alcântara *et al* (65) indican que el efecto que obtuvieron al agregar miel de abeja en el yogur de cabra fue la de una ligera reducción del pH inicial de 4.43 aproximadamente 0,2 unidades debido a su acidez natural ya que esta varía de acuerdo al tiempo.

No obstante Agarwal *et al* (83) señalaron que al agregar pulpa de zanahoria en el yogurt congelado el pH disminuyó de acuerdo a los niveles aumentados de la pulpa de la zanahoria

esto se debe principalmente a la fermentación del azúcar ya la conversión de la lactosa al ácido láctico producidos durante el proceso.

En la siguiente tabla, se detalla el efecto de los híbridos (Factor B) durante el proceso de fermentación en híbridos de cacao (*Theobroma cacao* L.) sobre el pH.

Tabla 18. *Efecto de los híbridos durante el proceso de fermentación en almendras de cacao (Theobroma cacao L.) sobre pH.*

Tiempo de fermentación	Hibrido DIRCYT 258	Hibrido d DIRCYT 259	Hibrido DIRCYT 263	Hibrido DIRCYT 265	p<
24 horas	4.04 a	3.99 a	4.08 a	3.69 b	0.0001 **
48 horas	4.10 a	4.03 a	4.19 a	4.27 a	0.2042 NS
72 horas	3.99 a	3.96 a	3.90 a	3.99 a	0.8257 NS

Promedios con letras iguales no difieren estadísticamente, según Tukey ($p<0.05$); NS = No significativo; * = Significativo; ** = Altamente significativo.

La presente tabla indica que existió alta significancia estadística ($p<0.05$) en los híbridos evaluados durante la etapa inicial del proceso de fermentación (24h), pues el nivel de pH de los materiales DIRCYT 258 y 263 reflejaron valores por encima del 4.00, sin embargo antes de iniciar la fermentación estos mismos híbridos fueron los que contemplaban valores altos de pH (4.01 – 3.37) en comparación con el resto de híbridos estudiados ya que a partir de las 72 se inicia un decrecimiento de los materiales vegetativos sobre el potencial de hidrogeno.

Estos resultados obtenidos se asemejan a los descritos por Da Veiga *et al* (62) quienes indicaron que el valor del pH varió durante todo el proceso de fermentación en los híbridos evaluados teniendo valores que varían de 4 a 4.06 siendo el PH 15 (Porto Hibrido) quien obtuvo un nivel adecuado (4.03 a 4.79).

Además Apriyanto *et al* (84) realizaron un preacodicionamiento del cacao con el fin de obtener un 15% de contenido de maduración de la pulpa al mismo nivel que el contenido de humedad en el que durante los primeros dos días de fermentación, el pH Cacao en grano se

registró 5.7 ± 0.1 y disminuyó a 3.8 ± 0.1 a las 48h de fermentación, y al final de la fermentación fue leve aumentando a 4.5 ± 0.2.

En la tabla 19, se muestra la interacción de los tratamientos sobre los niveles de pH obtenidos durante el proceso de fermentación de cacao, en los cuales no presentaron significancia estadísticas ($p<0.05$) durante todo el proceso de fermentación de cacao, sin embargo en el transcurso de la primera fase de fermentación (24h) los materiales evaluados obtuvieron un rango de 4.0 - 3.7 pH, siendo los tratamientos 2, 4 y 6 quienes obtuvieron un mayor nivel de pH en comparación con el resto.

Durante las 48 horas posteriores el nivel de potencial de hidrogeno aumento ligeramente sus niveles, mientras para las 72 horas siguientes estos niveles disminuyeron obteniendo datos bajos en comparación a los descritos por Thompson *et al* y Afoakwa *et al* (85,77) quienes mencionan que el cacao fermentado con un pH entre 5.5 - 5.8 es considerado como un fermentado regular mientras que el cacao que obtiene con pH entre 4.75 - 5.19 se lo categoriza como un fermentado ideal.

Así mismo Senanayake *et al* (86) describen que la variación del pH durante la fermentación está influenciada directamente por los procesos de degradación realizados por acción de microorganismos, por efecto del mezclado o remoción, además de las condiciones climáticas.

Tabla 19. *Composición físico - química del proceso de fermentación (24, 48 y 72 horas) en híbridos de cacao (Theobroma cacao* L.*) mediante la adición de musáceas.*

	pH								p<		
Tiempo de fermentación	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8	A	B	A x B
24 horas	3.81 b	4.27 a	3.72 b	4.26 a	3.91 ab	4.26 a	3.64 b	3.72 b	0.0001 **	0.0010*	0.1325 NS
48 horas	4.05 a[/]	4.15 a	3.92 a	4.14 a	4.13 a	4.24 a	4.29 a	4.25 a	0.2480 NS	0.2042 NS	0.7325 NS
72 horas	3.99 a	3.98 a	4.14 a	3.79 a	4.08 a	3.71 a	3.95 a	4.03 a	0.0534 NS	0.8257 NS	0.1310 NS

T1 = hibrido de cacao DIRCYT-258 + 30g de puré de banano; T2 = hibrido de cacao DIRCYT-258 + 30g de puré de plátano; T3 = hibrido de cacao DIRCYT-259 + 30g de puré de banano; T4 = hibrido de cacao DIRCYT-259 + 30g de puré de plátano; T5 = hibrido de cacao DIRCYT-263 + 30g de puré de banano; T6 = hibrido de cacao DIRCYT-263 + 30g de puré de plátano; T7 = hibrido de cacao DIRCYT-265 + 30g de puré de banano; T8 = hibrido de cacao DIRCYT-265 + 30g de puré de plátano; A = factor A (2 tipos musáceas banano y plátano); B = factor B (4 híbridos de cacao); A x B = interacción factor A (2 tipos musáceas banano y plátano); B = factor B (4 híbridos de cacao); [1/] = Promedios con letras iguales no difieren estadísticamente, según Tukey ($p<0.05$): NS = No significativo; * = Significativo; ** = Altamente significativo.

4.1.2.2. Temperatura.

En la tabla 20, se indica el efecto de las musáceas (Factor A) durante los tres tiempos evaluados (24, 48 y 72 horas) durante el proceso de fermentación en híbridos de cacao.

Tabla 20. *Efecto de las musáceas durante el proceso de fermentación en híbridos de cacao (Theobroma cacao* L.*) sobre temperatura.*

Tiempo de fermentación	Puré de banano	Puré de plátano	p<
24 horas	28.48 a	28.45 a	0.7129 NS
48 horas	27.80 a	28.33 a	0.0941 NS
72 horas	28.36 a	28.65 a	0.2598 NS

Promedios con letras iguales no difieren estadísticamente, según Tukey (p<0.05); NS = No significativo; * = Significativo; ** = Altamente significativo.

Se puede observar que no existió significancia estadística (p<0.05) en las musáceas durante el proceso de fermentación (24, 48 y 72 horas), sin embargo en las primeras 24h ambos puré tienen valores similares a 28 ºC, sin embargo la temperatura inicial de los purés de musáceas reflejaron valores de 25 ºC ± .015, por lo que se refleja que hubo un incremento de temperatura, luego a las 48 y 72 horas el puré de plátano se mantuvo a una temperatura constante, manteniéndose con ligeras variaciones de centenas en el grado de temperatura.

Por otro lado Biehl, & Passern (87) indican que el efecto de la temperatura de preincubación en las semillas de cacao disminuye en presencia de una alta concentración de ácido acético, por lo que no depende de los microorganismos, de la exudación o de la interacción de las proteínas y los polihidroxifenoles, además estos mismos autores señalan que el aumento de la proteólisis después de la incubación a 40 ° C se correlaciona con los cambios estructurales en las vacuolas de proteínas y con la absorción de agua por las semillas intactas, obteniendo una relación causal.

En cambio Wills *et al* (88)señala que la temperatura del banano y plátano tienen variación diferente con relación al grado de madurez de la fruta ya que durante la maduración el

almidón que comprende el 80% del peso seco de la fruta se convierte en sacarosa, glucosa y fructosa, elevando el proceso de respiración de los tejidos.

Se detalla a continuación el efecto de los híbridos (Factor B) durante el proceso de fermentación en híbridos de cacao (*Theobroma cacao* L.) sobre el temperatura.

Tabla 21. *Efecto de los híbridos durante el proceso de fermentación en almendras de cacao (Theobroma cacao L.) sobre temperatura.*

Tiempo de fermentación	Hibrido DIRCYT 258	Hibrido DIRCYT 259	Hibrido DIRCYT 263	Hibrido DIRCYT 265	p<
24 horas	28.33 a	28.46 a	28.53 a	28.46 a	0.3351 NS
48 horas	28.45 a	27.82 a	27.90 a	28.10 a	0.4749 NS
72 horas	28.41 ab	29.20 a	28.76 a	27.67 b	0.0019 *

Promedios con letras iguales no difieren estadísticamente, según Tukey (p<0.05)

La presente tabla indica que existió significancia estadística (p>0.05) en los híbridos evaluados durante la tercera etapa inicial del proceso de fermentación (72h), pues se refleja que el material DIRCYT – 259 fue el que presento la mayor temperatura en comparación con el resto de híbridos de cacao, mientras que el material DIRCYT – 265 obtuvo el grado más bajo de temperatura.

Durante las primeras 24 y 48 horas de fermentación los híbridos de cacao se mantenían constantes en las temperaturas, realizando pequeñas variaciones en las centenas de sus grados, sin embargo los valores iniciales de los materiales estuvo reflejado por temperaturas de 24 ºC ± 1.15.

Sin embargo los resultados obtenidos de las primeras 24h son superiores a los descrito por Da Veiga *et al* (62) donde señalaron que las temperaturas iniciales dentro de las cajas de fermentación de los híbridos de cacao evaluados fueron diferentes y que la temperatura inicial de sus materiales como el PH 16 varió de 24.3ºC a 24 h hasta un máximo de 47.4ºC a 144 h., mientras que la temperatura del híbrido PH 15 fue de 23.7 a 49.6ºC a 132 h, para luego al final de la fermentación (144 h) híbridos PH 9 y PH 15 alcanzaron valores de 44 ° C y 45.1 ° C, respectivamente

En la tabla 22, se muestra la interacción de los factores con proporción a la temperatura obtenida en el proceso de fermentación de cacao, en la que se observa que no presentó significancia estadística ($p<0.05$) durante el proceso de fermentación de cacao, sin embargo los tratamientos 4 y 6 obtuvieron un nivel elevado de temperatura, mientras que durante las primeras 24 horas los materiales iniciaron con valores por encima de los 28.0 ºC, este resultado de la fase inicial de fermentación (24h) son inferiores a los señalados por Thompson *et al* y Lagunes *et al* (20,89) quienes muestran que la temperatura de la masa del grano al inicio de la fermentación es de 25 ºC; mientras que al final se alcanzan temperaturas cercanas a 50 ºC, por lo que este mismo se incrementa ligeramente en 1.5% por encima al hibrido D259 en relación con el tiempo de 72h (31.0 ºC).

A partir de las 48 horas correspondientes a la fermentación los híbridos disminuyeron ligeramente su temperatura a excepto del tratamiento 2 y 8 quienes mostraron los valores más alto, mientras que el resto se mantenía en un rango de 27.5 ºC ± 0.39, estos valores se asemejan a los descritos por García (90) quien señala que el comportamiento de la temperatura se puede ver afectado por el volumen de la masa de cacao y la remoción de la misma ya que durante las primeras 48 h la temperatura fluctúa entre 26 a 45 ºC y puede llegar hasta 60 ºC posteriormente.

Tabla 22. *Composición físico - química del proceso de fermentación (24, 48 y 72 horas) en híbridos de cacao (Theobroma cacao* L.*) mediante la adición de musáceas.*

Tiempo de fermentación	Temperatura								p<		
	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8	A	B	A x B
24 horas	28.17 a	28.50 a	28.60 a	28.32 a	28.70 a	28.32 a	28.45 a	28.60 a	0.7129 NS	0.3351 NS	0.2077 NS
48 horas	28.07 a	28.82 a	27.90 a	27.75 a	27.87 a	27.92 a	27.37 a	28.82 a	0.0941 NS	0.4749 NS	0.2508 NS
72 horas	28.40 ab	28.42 ab	28.92 ab	29.47 a	28.27 ab	29.25 a	27.87 ab	27.47 b	0.2598 NS	0.0019 *	0.2519 NS

T1 = hibrido de cacao DIRCYT-258 + 30g de puré de banano; T2 = hibrido de cacao DIRCYT-258 + 30g de puré de plátano; T3 = hibrido de cacao DIRCYT-259 + 30g de puré de banano; T4 = hibrido de cacao DIRCYT-259 + 30g de puré de plátano; T5 = hibrido de cacao DIRCYT-263 + 30g de puré de banano; T6 = hibrido de cacao DIRCYT-263 + 30g de puré de plátano; T7 = hibrido de cacao DIRCYT-265 + 30g de puré de banano; T8 = hibrido de cacao DIRCYT-265 + 30g de puré de plátano; A = factor A (2 tipos musáceas banano y plátano); B = factor B (4 híbridos de cacao); A x B = interacción factor A (2 tipos musáceas banano y plátano); B = factor B (4 híbridos de cacao); [1/] = Promedios con letras iguales no difieren estadísticamente, según Tukey ($p<0.05$): NS = No significativo; * = Significativo; ** = Altamente significativo.

4.1.2.3. Acidez titulable.

En la tabla 23, se muestra el efecto de las musáceas (Factor A) durante los tres tiempos evaluados (24, 48 y 72 horas) durante el proceso de fermentación en híbridos de cacao sobre la acidez titulable.

Tabla 23. *Efecto de las musáceas durante el proceso de fermentación en híbridos de cacao (Theobroma cacao* L.*) sobre la acidez titulable.*

Tiempo de fermentación	Puré de banano	Puré de plátano	p<
24 horas	1.16 a	1.41 a	0.5918 NS
48 horas	1.25 a	1.21 a	0.2490 NS
72 horas	1.23 a	1.20 a	0.3845 NS

Promedios con letras iguales no difieren estadísticamente, según Tukey ($p<0.05$); NS = No significativo; * = Significativo; ** = Altamente significativo.

Se puede observar que no existió significancia estadística ($p<0.05$) en las musáceas durante el proceso de fermentación (24, 48 y 72 horas), sin embargo en las primeras 24h, el puré de plátano obtuvo el valor más alto en acidez con relación al puré de banano, mientras que en las siguientes 48h el puré de banano incremento levemente su acidez y es a partir de las 72 horas que ambos musáceas decrecen simultáneamente. Estas variaciones se produjeron debido al contenido de azucares, pues al realizar el puré de las musáceas se obtuvieron valores de 21.2 ^{o}Bx en de banano y 33.4 para el de plátano.

Según García e*t al* (91) indican que los cambios de acidez generados en los diferente tiempo de fermentación está influenciado por el proceso de evaporación ya que es dominante en el mucilago permitiendo una eliminación o expulsión de cierta cantidad de ácido acético, creando gradientes internos del centro hacia la periferia que provocan el decrecimiento de la concentración de ácido acético en el cotiledón del grano.

En cambio Alcântara *et al* (65) indican que el efecto de agregar miel de abeja en el yogur de cabra ocasiona el aumento de la acidez durante el almacenamiento, esta mayor acidez producida en los yogures que contienen miel puede estar asociada con la presencia de

oligosacáridos prebióticos en la miel de abeja porque estos compuestos se encuentran en cantidades tan pequeñas que pueden promover el crecimiento y la actividad metabólica de las bacterias del ácido láctico.

Por otro lado Cornejo *et al* (92) revela que durante la madurez del banano se caracteriza por el aumento progresivo de la acidez titulable desde la etapa 1 hasta la etapa 5 y la segunda por la disminución de la misma desde la etapa 5 hasta la 7 e indica que esto se da por el alto consumo de ácido en el banano por los procesos respiratorios como el ciclo de los ácidos tricarboxílicos

Se muestra en la siguiente tabla el efecto de los híbridos (Factor B) durante el proceso de fermentación en híbridos de cacao, sobre acidez titulable.

Tabla 24. *Efecto de los híbridos durante el proceso de fermentación en almendras de cacao (Theobroma cacao L.) sobre acidez titulable.*

Tiempo de fermentación	Hibrido DIRCYT 258	Hibrido DIRCYT 259	Hibrido DIRCYT 263	Hibrido DIRCYT 265	p<
24 horas	1.16 ab	1.24 a	1.12 ab	1.08 b	0.0399 *
48 horas	1.27 a	1.28 a	1.18 a	1.19 a	0.0485 NS
72 horas	1.25 a	1.23 a	1.17 a	1.21 a	0.4350 NS

Promedios con letras iguales no difieren estadísticamente, según Tukey (p<0.05); NS = No significativo; * = Significativo; ** = Altamente significativo.

La presente tabla indica que existió significancia estadística (p>0.05) en los híbridos evaluados durante la etapa inicial del proceso de fermentación (24h), pues se refleja que el material DIRCYT – 259 fue el que presento la mayor porcentaje de acidez en comparación con el resto de híbridos de cacao, mientras que durante las 48 horas se incrementaron 1.23 ± 0.065 de acidez para después disminuir ligeramente su contenido en las 72h posteriores.

Los resultados acidez obtenidos de las 48 h de fermentación se asemejan a los descritos por Apriyanto *et al* (84) quienes indican que la fermentación de los granos de cacao causa un aumento significativo en los niveles de acidez de los granos de cacao, produciéndose el nivel de acidez más alto durante las 48 h de fermentación ya que la mayoría de los azúcares de la

pulpa se degradaron probablemente en alcoholes y luego se oxidaron a ácido acético por bacterias de ácido acético.

Por otro lado Ardhana & Fleet (48) informaron que la mayor concentración de ácido acético (10 mg / g de muestra) en la pulpa de cacao se produjo a las 72 h (3 días) de fermentación. Ya que los niveles de acidez disminuyeron después de 3 días de fermentación, debido a que la mayor parte del ácido producido se difundió en los frijoles, además a medida que el volumen de pulpa disminuyó, se produjo una mejora en la aireación en la fermentación de la biomasa (pulpa).

En la tabla 25 se muestra las interacciones de los factores donde se registra la acidez obtenida en las almendras de cacao, las cuales no presentaron significancia estadística ($p>0.05$) en los tratamientos durante el tiempo evaluado (24, 48 y 72h) de fermentación, pues a partir de las 24h el tratamiento 3 (1.28%) obtuvo el mayor porcentaje de acidez en las almendras, mientras durante las 48h posteriores este nivel de acidez aumento en la mayoría de los tratamientos a excepto del T4 y T8 cuyos valores disminuyeron, por lo que en el transcurso de las 72h existió una variabilidad entre incremento y decrecimiento de acidez en las almendras de cacao.

Estos resultados de acidez obtenidos son menores a los reportados por Armijos (93) quien indica que el ácido orgánico de mayor contenido en el cacao es el ácido acético ya que es un representante de los ácidos volátiles, además que al realizar pruebas de acidez titulable en fincas cacaoteras del cantón Ventanas durante las 48 y 96h obtiene un valor de 1.52 - 1.92% de acidez llegando a incrementar en 0.26% más en el lapso de 120h.

Además los valores de los porcentajes de acidez de los híbridos evaluados concuerdan con el trabajo descrito por Jinap *et al* (94) quienes revelan que las almendras fermentadas presentan una acidez mayor al 1%, con base en ácido acético, pues estas influyen directamente en la calidad del chocolate.

Así mismo Camala *et al* (95) analizaron muestras de granos de cacao fermentados de diferentes regiones del mundo en donde las concentraciones (kg^{-1}) de ácidos variaron de 1.3 a 11.8 para el ácido acético de 1 - 6 a 9 - 9 para el ácido cítrico de 0.6 a 11.1 para el ácido láctico y de 2.1 a 6.5 para el ácido oxálico, mientras que la acidez titulable presente en las semillas varió de 0.08 a 0.31 equivalentes de hidróxido sódico por kg de muestra.

Tabla 25. *Composición físico - química del proceso de fermentación (24, 48 y 72 horas) en híbridos de cacao (Theobroma cacao* L.*) mediante la adición de musáceas.*

	Acidez titulable								p<		
Tiempo de fermentación	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8	A	B	A x B
24 horas	1.20 a	1.12 a	1.28 a	1.20 a	1.10 a	1.14 a	1.06 a	1.09 a	0.5918 NS	0.0399 *	0.5113 NS
48 horas	1.33 a	1.23 a	1.30 a	1.26 a	1.13 a	1.22 a	1.24 a	1.12 a	0.2490 NS	0.0485 NS	0.1586 NS
72 horas	1.29 a	1.21 a	1.23 a	1.24 a	1.12 a	1.22 a	1.29 a	1.14 a	0.3845 NS	0.4350 NS	0.1095 NS

T1 = hibrido de cacao DIRCYT-258 + 30g de puré de banano; T2 = hibrido de cacao DIRCYT-258 + 30g de puré de plátano; T3 = hibrido de cacao DIRCYT-259 + 30g de puré de banano; T4 = hibrido de cacao DIRCYT-259 + 30g de puré de plátano; T5 = hibrido de cacao DIRCYT-263 + 30g de puré de banano; T6 = hibrido de cacao DIRCYT-263 + 30g de puré de plátano; T7 = hibrido de cacao DIRCYT-265 + 30g de puré de banano; T8 = hibrido de cacao DIRCYT-265 + 30g de puré de plátano; A = factor A (2 tipos musáceas banano y plátano); B = factor B (4 híbridos de cacao); A x B = interacción factor A (2 tipos musáceas banano y plátano); B = factor B (4 híbridos de cacao); [1/] = Promedios con letras iguales no difieren estadísticamente, según Tukey ($p<0.05$): NS = No significativo; * = Significativo; ** = Altamente significativo.

4.1.2.4. Grados Brix.

En la tabla 26, se muestra el efecto de las musáceas (Factor A) durante los tres tiempos evaluados (24, 48 y 72 horas) durante el proceso de fermentación en híbridos de cacao sobre los grados Brix.

Tabla 26. *Efecto de las musáceas durante el proceso de fermentación en híbridos de cacao (Theobroma cacao* L.*) sobre los grados Brix.*

Tiempo de fermentación	Puré de banano	Puré de plátano	p<
24 horas	18.25 b	22.69 a	0.0001 **
48 horas	11.81 b	14.03 a	0.0025 *
72 horas	7.10 b	10.98 a	0.0001 **

Promedios con letras iguales no difieren estadísticamente, según Tukey (p<0.05); NS = No significativo; * = Significativo; ** = Altamente significativo.

Se observa que existió alta significancia estadística (p>0.0001) en las musáceas durante las 24 y 72 horas del proceso de fermentación, mientras que para el periodo de 48h fue significativo (p<0.05), sin embargo en las primeras 24h, el puré de plátano obtuvo el valor más alto en azucares con 4.44% de diferencia con relación al puré de banano, manteniéndose así durante el resto de tiempo evaluado con un de variación en solidos soluble totales. Estas variaciones se produjeron debido al contenido de azucares, pues al realizar el análisis al puré de las musáceas antes de adicionarlas al cacao, se obtuvieron valores de 21.2 ºBx en de banano y 33.4 para el de plátano.

En cambio Marriott *et al* (96) indica que en los bananos la descomposición del almidón y la síntesis del azúcar usualmente se completan al alcanzar la maduración total (grado del color de la cáscara 6-7), mientras que en el plátano esta descomposición es más lenta y menos completa y continúa en las frutas muy maduras y senescentes.

Según Dadzie & Orchard (97) revelan que el azúcar en las frutas de banano y plátano usualmente aumenta a medida que las frutas maduran, el contenido de sólidos solubles de la fruta varía entre los cultivares y entre los grados de madurez de las mismas.

Además Nielsen *et al* (47) indica que la reducción de solidos solubles totales de los azucares de la pulpa es debido a la influencia de la acción de las levaduras para convertir los sólidos en etanol y dar así a la producción de bacterias acéticas.

En la siguiente tabla, se detalla el efecto de los híbridos (Factor B) durante el proceso de fermentación en híbridos de cacao (*Theobroma cacao* L.) sobre grados Brix.

Tabla 27. *Efecto de los híbridos durante el proceso de fermentación en almendras de cacao (Theobroma cacao L.) sobre grados Brix.*

Tiempo de fermentación	Hibrido DIRCYT 258	Hibrido DIRCYT 259	Hibrido DIRCYT 263	Hibrido DIRCYT 265	p<
24 horas	19.16 b	21.56 a	19.56 ab	21.60 a	0.0093 *
48 horas	11.35 b	11.20 b	13.18 b	15.95 a	0.0001 **
72 horas	8.60 a	8.32 a	10.12 a	9.12 a	0.1037 NS

Promedios con letras iguales no difieren estadísticamente, según Tukey (p<0.05); NS = No significativo; * = Significativo; ** = Altamente significativo.

La presente tabla indica que existió significancia estadística (p>0.05) en los híbridos evaluados durante las (24h) mientras que en las 48h posteriores del proceso de fermentación presentaran alta significancia estadística (p>0.0001) pues se refleja que en ambos tiempos el material DIRCYT – 265 fue el que obtuvo a mayor porcentaje de grados Brix en comparación con el resto de híbridos de cacao, esta variación se produjo debido a que antes de iniciar el proceso de fermentación, este hibrido obtuvo el mayor porcentaje de grados Brix con un valor aproximado de 13.44 ºBx , lo cual infirió en el aumento de azucares de los materiales vegetativos.

Sin embargo se observa un decrecimiento lineal de solidos soluble totales en relación al tiempo del proceso de fermentación, esto se asemeja a lo descrito por Da Veiga *et al* (62) los cuales indican que el consumo de azúcares y ácido cítrico y la formación de metabolitos durante la fermentación de los tres híbridos ocurre rápidamente durante las primeras horas (0-72 h), siendo así el Hibrido de cacao PH 16 el que alcanzó mayores concentraciones iniciales de 15.77 y 1.54 % , respectivamente. El consumo de estos compuestos fue similar durante la fermentación de los tres híbridos.

En la tabla 28, se indica el contenido de azucares medido en grados Brix no generó un efecto en las interacciones de los dos factores estudiados, pues no presentaron significancias estadística ($p<0.05$), sin embargo durante las 24h los tratamientos 4 y 8 (ambos adicionado con puré de Plátano) obtuvieron una mayor cantidad de solidos soluble totales, así mismo a partir de la segunda y tercera etapa de fermentación (48, 72h) el mismo tratamiento 8 lideró con los valores más altos de azucares, en comparación con el resto de tratamientos evaluados.

Sin embargo Cros *et al* (42) indican que el alto contenido de azúcares en la pulpa favorece el desarrollo de microorganismos como las levaduras durante el proceso fermentativo, las cuales promueven la fermentación alcohólica, produciendo un aumento de la acidez y de la temperatura que conlleva a la muerte del embrión.

Por otro parte los resultados obtenidos en el ensayo son similares a los descritos por Álas *et al* (56) en los que expresan que los clones y variedad de cacao evaluados en su proyecto se mostraron en forma descendente durante todo el proceso con la diferencia que los valores más altos fueron los alcanzados por las mazorcas con almacenamiento de 3 días con valores de 22.26 a 20.86 º Brix para el cacao criollo.

Según Schawn *et al* (98) indican que el nivel de azúcares en la pulpa es un rasgo genético, por lo que aún se desconoce cómo esa composición afecta directamente con el tiempo de fermentación según el tipo de cacao.

Tabla 28. *Composición físico - química del proceso de fermentación (24, 48 y 72 horas) en híbridos de cacao (Theobroma cacao* L.*) mediante la adición de musáceas.*

	Grados Brix								p<		
T.F	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8	A	B	A x B
24 h	15.87 d	22.45 ab	19.35 bcd	23.77 a	17.87 cd	21.25 abc	19.90 abc	23.30 a	0.0001**	0.0093 *	0.2096 NS
48 h	11.10 cd	11.60 cd	9.65 d	12.75 abcd	10.92 d	15.45 abc	15.75 ab	16.32 a	0.0025*	0.0001**	0.1197 NS
72 h	7.17 b	10.02 ab	7.05 b	9.60 ab	7.20 b	13.05 a	6.97 b	11.27 a	0.0001**	0.1037 NS	0.1283 NS

T.F = Tiempo de fermentación; h = Horas; T1 = hibrido de cacao DIRCYT-258 + 30g de puré de banano; T2 = hibrido de cacao DIRCYT-258 + 30g de puré de plátano; T3 = hibrido de cacao DIRCYT-259 + 30g de puré de banano; T4 = hibrido de cacao DIRCYT-259 + 30g de puré de plátano; T5 = hibrido de cacao DIRCYT-263 + 30g de puré de banano; T6 = hibrido de cacao DIRCYT-263 + 30g de puré de plátano; T7 = hibrido de cacao DIRCYT-265 + 30g de puré de banano; T8 = hibrido de cacao DIRCYT-265 + 30g de puré de plátano; A = factor A (2 tipos musáceas banano y plátano); B = factor B (4 híbridos de cacao); A x B = interacción factor A (2 tipos musáceas banano y plátano); B = factor B (4 híbridos de cacao); [1/] = Promedios con letras iguales no difieren estadísticamente, según Tukey ($p<0.05$): NS = No significativo; * = Significativo; ** = Altamente significativo.

4.1.2.7. Prueba de corte (cut test).

El porcentaje de fermentación obtenido en esta evaluación, presento significancia estadística ($p<0.05$) en los híbridos, pues la acción de las musáceas no tuvo mayor variabilidad con respecto al grado de fermentación, siendo el D265 quien alcanzo el 79% de fermentación, cabe recalcar que el resto de híbridos presentaron valores por encima del 75%, el efecto producido en las almendras pudo ser por la acidificación debido a la presencia de ácido acético durante la fermentación ya que conduce a varios cambios bioquímicos tales como la generación de péptidos y aminoácidos de proteínas de reserva por acción de proteasas de la semilla y azúcares reductores, que son compuestos precursores de las reacciones de Maillard que ocurren durante el secado y tostado de las semillas Rohan & Stewart (99)

Estos resultados son inferiores a los registrados por Campuzano (100) quien indica que el material de Ecuador como el EET-103 (Nacional) presenta un grado de fermentación del 90%, al igual que el IMC-67 con un 97%.

El grado de fermentación obtuvieron grados de fermentación, por encima del 75% excepto el Hibrido D263 pues en sus dos combinaciones de masa de musáceas (10%banano y 10% plátano) presento los valores más bajos de la investigación 64-67% respectivamente, por otro lado Misnawi *et al* (101) sustenta que los cambios en el grado de fermentación durante el proceso son solo el resultado de reducciones en la concentración de polifenoles e indica que la polifenol oxidasa es responsable de catalizar las reacciones de oxidación de o-difenol a o-quinon; O-quinonas las cuales dan el color marrón respectivo de las almendras y cuya temperatura óptima para su actividad es de 42 a 45 ° C.

Así Lagunez *et a*l (89) indican que el color de los frijoles cambiará de púrpura a marrón, que usualmente se utiliza como indicador para la etapa de maduración de los frijoles, estos cambios bioquímicos espontáneos dentro del frijol reducen la amargura y astringencia de la almendra.

Tabla 29. *Composición físico - química del proceso de fermentación (24, 48 y 72 horas) en híbridos de cacao (Theobroma cacao* L.*) mediante la adición de musáceas sobre grados de fermentación.*

	Grado de Fermentación								p<		
T.F	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8	A	B	A x B
24 h	77.25 ab	73.00 ab	80.50 a	77.25 ab	67.25 ab	64.75 b	79.00 a	80.30 a	0.2924 NS	0.0003 *	0.7901 NS

T1 = hibrido de cacao DIRCYT-258 + 30g de puré de banano; T2 = hibrido de cacao DIRCYT-258 + 30g de puré de plátano; T3 = hibrido de cacao DIRCYT-259 + 30g de puré de banano; T4 = hibrido de cacao DIRCYT-259 + 30g de puré de plátano; T5 = hibrido de cacao DIRCYT-263 + 30g de puré de banano; T6 = hibrido de cacao DIRCYT-263 + 30g de puré de plátano; T7 = hibrido de cacao DIRCYT-265 + 30g de puré de banano; T8 = hibrido de cacao DIRCYT-265 + 30g de puré de plátano; A = factor A (2 tipos musáceas banano y plátano); B = factor B (4 híbridos de cacao); A x B = interacción factor A (2 tipos musáceas banano y plátano); B = factor B (4 híbridos de cacao); 1/ = Promedios con letras iguales no difieren estadísticamente, según Tukey ($p<0.05$): NS = No significativo; * = Significativo; ** = Altamente significativo.

Tabla 30. *Clasificación del grado de fermentación de cacao según la norma INEN 176.*

Hibrido de cacao	Grado de fermentación	Clasificación
DIRCYT 258	75.12 %	ASSS
DIRCYT 259	78.87 %	ASSS
DIRCYT 263	66.00 %	ASS
DIRCYT 265	79.62 %	ASSS

ASSS = Arriba Superior Summer Selecto; ASS = Arriba Superior Selecto

CAPÍTULO V

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1. Conclusiones.

- El efecto de la adición de musáceas como fuente de energía en el crecimiento microbiano no generó un aumento de unidades formadora de colonias de Bacterias lácticas, acéticas y levaduras en los híbridos experimentales de cacao durante el proceso de fermentación de cacao.

- Las variables físicas fueron las que presentaron cambios durante el proceso de fermentación, siendo los grados Brix los que determinaron variaciones durante el tiempo evaluados, mientras que el pH solo infirió durante las 24 primeras horas de haber iniciado la fermentación de híbridos de cacao.

- El hibrido DIRCYT-265 fue el que obtuvo mayor porcentaje de fermentación las almendras obtenidas mediante la adición de musáceas como fuente de energía en híbridos experimentales de cacao

5.2. Recomendaciones.

- Se recomienda utilizar otros tipos de azucares como fuentes de energía para el proceso de fermentación de cacao.

- Evaluar otros materiales propios de la zona o de interés comercial como es el caso del cacao CCN-51.

- Aumentar los niveles de azucares como fuente energía para el proceso de fermentación de cacao.

CAPÍTULO VI
BIBLIOGRAFÍA

6.1. Literatura citada

1. Sánchez-Mora F, Garcés F, Vera J, Ramos R, Troya F. Cuantificación de enfermedades en mazorcas de cacao (Theobroma cacao L.) en la zona central del Litoral Ecuatoriano. In Memorias del VIII Simposio Internacional de Recursos Genéticos para América Latina y El Caribe. Quito- Ecuador:; 2011.

2. FAO, MAGAP. Taller Nacional: La denominacion de origen para el cacao "Arriba" del Ecuador: La cadena de valor del cacao en el Ecuador: diagnóstico actual. [Online].; 2010 [cited 2016 septiembe 17. Available from: http://www.fao.org/fileadmin/templates/olq/Ecuador/ppp/taller%20nacional%203cuador/2DiagnosticoCadenaSergioPino,pdf.

3. Radi C. Estudio sobre los mercados de valor para el cacao Nacional de origen y con certificaciones. , CORPEI; 2005.

4. Anecaco. Exportaciones de cacao en Ecuador. ; 2015.

5. Navia Órces AA, Pazmiño Piedra NV. Mejoramiento de las Caracteristicas Sensoriales del Cacao CCN-51 a traves de las Adición de enzimas durante el Porceso de fermentación. Guayaquil:; 2012.

6. Wacher Rodarte MdC. Microorganismos y chocolate. Revista Digital Universitaria; 2011.

7. Buenaño R, Sancán P, Cedeño J. Estandarización del proceso de elaboración de licor de cacao y aplicación de un plan HACCP. Tesis Ingenieros Quimico. Guayaquil-Ecuador: Universidad de Guayaquil, Facultad de Ingenieria Quimica; 2011.

8. Sukha DA, Butler DR, Umaharan P, Boul E. The use of an optimised organoleptic assessment protocol to describe and quantify different flavour attributes of cocoa liquors made from Ghana and Trinitario beans. Eur Food Res Technol. 2008; 226(405–413).

9. Trognitz B, Cros E, Assemat S, Davrieux F, Forestier- Chiron N, Avestas E, et al.)

Diversity of cacao trees in Waslala, Nicaragua: associations between genotype spectra, product quality and yield potential. PLoS One. 2013; 8(540-559).

10. Sinche P. Evaluación de dos tiempos de fermentación con las adición de la enzima polifenol oxidasa y levadura Saccharomeces Cerevisae para mejorar las características de calidad (aroma y sabor) del cacao CCN-51 en la UTE Santo Domingo. Tesis Ingeniero Agroindustroal. Santo Domingo: Universidad Tecnologica Equinoccial, Faculad de Ciencias de la Ingenieria; 2013.

11. Diaz S, Pinargote M. Análisis de las características organolépticas del chocolate a partir de cacao CCN-51 tratado enzimáticamente y tostado a diferentes temperaturas. Tesis Ingenieros en Alimentos. Guayaquil-Ecuador: Escuela Superior Politécnica del Litoral, Facultad de Ingenieria en Mecanica y Ciencias de la Produccion; 2012.

12. Agroalimentaria Emmdc. El mercado mundial del cacao, Agroalimentaria. ; 2004.

13. Calderón M. Evaluación de los compuestos fenólicos del cacao (Theobroma cacao L) de tipo fino y ordinario de producción nacional durante la fermentación en relación con la calidad. Tesis de Licenciatura en Química. Quito-Ecuador: Pontificia Universidad Católica del Ecuador; 2002.

14. Fito P, LeMaguer M, Bertoret N. Advanced food process engineering to model real food and processes: The “SAFES” methodology. Journal of Food Engineering; 2007.

15. Perea J, Ramírez O, Villamizar A. Caracterización fisicoquímica de materiales regionales de cacao colombiano. UNICAUCA., Biotecnología en el sector Agropecuario y Agroindustrial; 2010.

16. Quinteros L, Díaz K. El mercado mundial del cacao. 9(18):51. , Rev. Agroalimentaria; 2004.

17. Monteiro W, Ahnret D. Melhoramento Genetico do Cacaueiro. , Ciéncia,Tecnologia e Manejo do Cacaueiro; 2007.

18. De la Mota I. El Libro del Chocolate. Segunda Edición. ; 2008.

19. Lagunes-Galvez.. Study on the microflora anda iochemistry of cocoa fermentation in the Dominican Republic. , International Journal of Food Microbiology; 2007.

20. Thompson S, Miller K, Lopez A. Cocoa & Coffee food microbiology: Fundamentals and fronte. Washington, DC:; 2001. Report No.: Second edition.

21. Carr F, Chill D, Maida N. The lactic acid bacteria: A literature survey. Critical Reviews in Microbiology. ; 2002.

22. Vásquez S, Suarez H, Zapata S. Utilización de sustancias antimicrobianas producidas por bacterias ácido lácticas en la conservación de la carne. Revista chilena de nutrición; 2009.

23. Hernández I, Barbero F. Bacterias acéticas: técnicas de detección y eliminación. , Guserbiot; 2008.

24. Samson R, Hesktra E, Frisvad J, Filtemborg O. Introducction to food and aireborne fung. 2da Ed. CBS Publications. Paises bajos:; 2000.

25. Cousin M, Riley R, Pestlka J. Foodborne mycotoxins: chemistry, biology, ecology and toxicology: Foodborne pathogen. Norfolk, Inglaterra.: Caister academic press; 2005.

26. Jiyoung K, Ki L, Hyong L. Cocoa (Theobroma cacao) Seeds and Phytochemicals in Human Health. En V. Preedy, R. Watson y V. Patel, Nuts and Seeds in Health and Disease Prevention. Elsevie; 2011.

27. Pérez R. Programa de capacitación a facilitadores y agricultores en la cadena de cacao. Estación Experimental Central de la Amazonía. Ecuador; 2009.

28. Dostert N, Roque J, Cano A, La Torre M, Weigend M. Hoja botánica: Cacao. Lima. Perú: Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Report No.: 1ed.

29. ProEcuador. Análisis del sector cacao y elaborados.. [Online].; 2013 [cited 2016 Septiembre 18. Available from: http://www.proecuador.gob.ec/wp-content/uploads/2013/08/PROEC_AS2013_CACAO.pdf.

30. INEC. Instituto Nacional de Estadística y Censos. Superficie, producción y ventas, según región y Provincia: Cacao (almendra seca). , Ecuador en cifras, ESPAC, Encuesta de Superficie y Producción Agropecuaria Continua; 2013.

31. Guia tecnologica del cultivo de cacao (Theobroma cacao L.). Guia tecnologica del cultivo de cacao (Theobroma cacao L.). Managua- Nicaragua: INTA ; 2010. Report No.: Ediciom N°4.

32. INIAP. Manual del cultivo de cacao 25: Antecedentes históricos, zonificación y ecología del cultivo de cacao. Quevedo- Ecuador. :; 1993. Report No.: 2da Edición.

33. Arguello O, Mejia A, Palencia G. Clasificación de especies cultivares de Theobroma cacao L. para el mejoramiento del sistema de multiplicación de cacao. Colombia: CORPOICA; 2000.

34. Enríquez G. Cacao orgánico: Guía para los productores ecuatorianos. Quito- Ecuador: INIAP; 2004. Report No.: Manual N°54.

35. Enríquez G. Curso sobre el cultivo del cacao. Turialba. Centro Agronomico Tropical De Investigacion y Enseñanza; 1985.

36. Landeta A, Coronel J. Principales procesos tecnológicos organizacionales y jurídicos para establecer la denominación de origen del cacao nacional fino y de aroma. Guayaquil: Escuela Superior Politécnica del Litoral; 2009.

37. INIAP. Influencia del prese-secado de las almendras sobre la evaluación del pH y porcentajes de fermentación durante la época seca en las variedades de cacao CCN-51 y Nacional. Pichilingue- Ecuador:; 2007.

38. ANECACAO. Origen del cacao en el Ecuador: Características de los cacaos finos y

ordinarios. Quito- Ecuador:; 2004. Report No.: 1era Edición.

39. Ortiz P. Elaboracion de un chocolate utilizando un edulcorante natural de Stevia. Tesis e Ingeniera Agroindustrial. Santo domingo, Ecuador: Universidad Tecnologica Equinoccial; 2012.

40. Mejia L, Arguello O. Tecnología para el mejoramiento del sistema de producción de cacao. Bucaramanga (Colombia): CORPOICA, Regional 7; 2000.

41. Alarcón E. Foro de las América para la Investigación y desarrollo tecnológico (FORAGRO): Un camino hacia su consolidación para la cooperación México: FORAGRO; 2001.

42. Cros E, Mermet G, Jenajean N, Georges G. "Relation Précurseurs Développement de L'arôme Cacao". Lagos-Nigeria:; 1994.

43. Rodríguez M, Motato N, Zambrano O, Tarquino C. Manejo técnico del cultivo de cacao en Manabí. Portoviejo. Ecuador: Instituto Nacional Autónomo de Investigación Agropecuaria, Estación Experimental Portoviejo. Ecuador; 2010.

44. Álvarez C. Caracterización y tipificación de los parámetros físicos, químicos, físico-químicos y componentes del sabor y aroma de una población de cacao criollo híbrido (Theobroma cacao L.) de Venezuela. Tesis de Doctorado en Ciencias. Venezuela: Universidad Central de Venezuela; 2008.

45. Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura (IICA). Memoria del seminario regional sobre tecnología post-cosecha y de calidad mejorada del cacao. Turrialba, Costa Rica.:; 1989.

46. Bertorelli L, Rovedas G, Fariñas L. Influencia de varios factores sobre índices físicos del grano de cacao en fermentación. Agronomía Tropical; 2009.

47. Nielsen DS, Teniola OD, Ban-Koffi L, Owusu M, Andersson TS. The microbiology of Ghanian cocoa fermentations analysed using culture-dependent and culture-independent

methods. International Journal of ´Food Microbiology. 114: 168-186. ; 2007.

48. Ardhana MM,FGH. The microbial ecology of cocoa bean fermentations in Indonesia. International Journal of Food Microbiology. ; 2003.

49. Andrade M. Evaluación de la viabilidad del uso de Lactobacillus acidophilus LA-5 en la elaboración de helados. Trabajo de graduación. Cuenca: Universidad del Azuay, Facultad de Ciencia y Tecnología, Escuela de Ingeniería en alimentos; 2013.

50. Lefeber T, Janssens M, Moens F, Gobert W, De Vuyst L. Interesting starter culture strains for controlled cocoa bean fermentation revealed by simulated cocoa pulp fermentations of cocoa-specific lactic acid bacteria. American Society for 87 Microbiology, Applied and Environmental Microbiology. Article. Brussels, Belgium: Vrije Universiteit Brussel, IMDO, Research Group of Industrial Microbiology and Food Biotechnology, Faculty of Sciences and Bioengineering Sciences; 2011. Report No.: Nº18.

51. Cleenwerck I, Camu N, Engelbeen K, De Winter T, Vandemeulebroecke K, De Vos P. Acetobacter ghanensis sp. nov., a novel acetic acid bacterium isolated from traditional heap fermentations of Ghanaian cocoa beans. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. Belgium: Ghent University, Faculty of Sciences; 2007. Report No.: Vol. 57.

52. Carrillo L BN, Carrillo L, Bejarano N. Mohos. UMSA; 2007.

53. Carlile M. The Fung. San Diego:; 2001. Report No.: 2ª ed. Academic Press.

54. Cesar Amilcar Alas Rivera. , Morales Solorzano AdS. Estandarizacion Del Proceso De Fermentacion De La Mezcla De Semillas De Tres Accesiones De Theobroma Cacao L. (Cacao) Del Cultivar San Jose Del Real De La Carrera Ubicada En El Departamento de Usultan. Tesis En Licenciado (A) En Quimica Y Farmacia.. El Salvador : Universidad De El Salvador , Facultad De Quimica Y Farmacia; 2015.

55. Prado M, Zambrano C. Caracterización del Proceso de Fermentación del Cacao Variedad Nacional Mediante el Uso de Técnicas Moleculares y de Detección de Compuestos de Aroma. Tesis Ingenieras en Alimentos. Guayaquil- Ecuador: Escuela Superior Politécnica Del Litoral, Facultad de Ingeniería en Mecánica y Ciencias de la Producción; 2015.

56. Alas J, Ríos R. Evaluación del proceso de fermentación tradicional y no tradicional de la semilla de cacao Theobroma cacao del Ecotipo Acriollado, por la determinación de factores físicos - químico y microbiológicos, utilizando cuatro medios de cultivos y levadura Saccha. Tesis Ingenieros en Alimentos y Agroindustrial. Cuscatlan: Universidad Dr. Jose Matias Delgado, Facultad De Agricultura E Investigación Agrícola; 2012.

57. Departamento Agrometeorológico del INIAP. Información Agrometeorológica ce la Finca Experimental "La María". Quevedo, Ecuador: Intituto Nacional de Meteorología e Hidrología (INAMHI), Estación Experimental Tropical Pichilingue; 2014.

58. Assumpção Fiorda , Vinicius de Melo G, Thomaz- Soccol V, Kumar Rakshit S, Binder Pagnoncelli G, Porto de Souza L, et al. Microbiological, biochemical, and functional aspects of sugary kefir fermentation - A review. Food Microbiology. 2017 Apr.

59. Ikram-Ul H, Ali S. Kinetics of invertase production by Saccharomyces cerevisiae in batch cultures. Pakistan Journal of Botany. 2007; 39(907-912).

60. Bajwa , Mittal S. Quality characteristics of no added sugar ready to drink milk. J Food Sci Technol. 2013 Oct;(9p).

61. Tarakçi Z, Küçüköner E. .

62. da Veiga Moreira IM, da Cruz Pedrozo Miguel MG, Ferreira Duarte W, Ribeiro Dias D, Freitas Schwan. Microbial succession and the dynamics of metabolites and sugars during the fermentation of three different cocoa (Theobroma cacao L.) hybrids. Elsevier. 2013 Jun; 54(9–17).

63. Pereira GVM, Miguel MGC, Ramos CL, Schwan R. Microbiological and physicochemical characterization of small-scale cocoa fermentations and screening of yeast and bacteria strains to develop a defined starter culture. Applied and Environmental Microbiology. 2012; 78(5395–5405).

64. Schwan RF. Cocoa fermentations conducted with a defined microbial cocktail inoculum. Applied and Environmental Microbiology. 1998; 64(1477-1483).

65. Dourado Gomes Machado TA, Gomes de Olivieira ME, Ferreira Campos MI, Antonino de Assis PO, Leite de Sousa E, Suely Madruga M, et al. Impact of honey on quality characteristics of goat yogurt containing probiotic. Food Science and Technology. 2017 Feb.

66. Magalhães KT, De Melo Pereira GV, Dias DR, Schwan RF. Microbial communities and chemical changes during fermentation of sugary Brazilian kefir. World Journal of Microbiology and Biotechnology. 2010; 33(1-10).

67. Camu N, de Winter T, Addo SK, Takrama JS, Bernaert H, de Vuyst L. Fermentation of cocoa beans: influence of microbial activities and polyphenol concentrations on the flavour of chocolate. Journal of the Science of Food and Agriculture. 2008; 88(2288-2297).

68. Schwan RF, Rose AH, Board RG. Microbial fermentation of cocoa beans with emphasis on enzymatic degradation of the pulp. Journal of Applied Bacteriology. 1995; 79(S96-S107).

69. Pereira GVM, Magalhães KT, Almeida EG, Coelho ISC, Schwan RF. Spontaneous cocoa bean fermentation carried out in a novel-design stainless steel tank: Influence on the dynamics of microbial populations and physical–chemical properties. International Journal of Food Microbiology. 2013; 161 (121–133).

70. Afoakwa EO, Paterson A, Fowler M, Ryan A. Flavor formation and character in cocoa and chocolate: A critical review. Critical Reviews in Food Science and Nutrition. 2008;

48(840–857).

71. Schwan RF, Wheals AE. The microbiology of cocoa fermentation and its role in chocolate quality. Critical Reviews in Food Science and Nutrition. 2004; 44(205- 221).

72. Camu N, De Winter T, Verbrugghe K, Cleenwerck I, Takrama JS, Vancanneyt M, et al. Dynamics and biodiversity of lactic acid bacteria and acetic acid bacteria populations involved in spontaneous heap fermentations of cocoa beans in Ghana.. Appl Environ Microbiol. 2007; 73(1809–1824).

73. Lefeber T, Janssens M, Moens F, Gobert W, De Vuyst L. Interesting starter culture strains for controlled cocoa bean fermentation revealed by simulated cocoa pulp fermentations of cocoa-specific lactic acid bacteria. Appl Environ Microbiol. 2011; 77(6694–6698).

74. Papalexandratou Z, De Vuyst L. Assessment of the yeast species composition of cocoa bean fermentations in different cocoa-producing regions using denaturing gradient gel electrophoresis. FEMS Yeast Res. 2011; 11(564–574).

75. Camu N, Gonzalez A, de Winter T, van Schoor A, de Bruyne K, Vandamme P, et al. Influence of turning and environmental contamination on the dynamics of populations of lactic acid and acetic acid bacteria involved in spontaneous cocoa bean heap fermentation in Ghana. Applied and Environmental Microbiology. 2008; 74(86-98).

76. Galvez SL, Loiseau G, Paredes JL, Barel M, Guiraud JP. Study on the microflora and biochemistry of cocoa fermentation in the Dominican Republic. International Journal of Food Microbiology. 2007; 114(124-130).

77. Afoakwa EO, Paterson A, Fowler M, Ryan A. Flavor formation and character in cocoa and chocolate: A critical review. Critical Reviews in Food Science and Nutrition. 2008; 48(840–857).

78. Lima LJR, Almeida MH, Nout , Zwietering MH.) Theobroma cacao L., “The food of the gods”: quality determinants of commercial cocoa beans, with particular reference to

the impact of the fermentation. Crit Rev Food Sc Nutr. 2011; 52(731–761).

79. Dormond H, Rojas A, Mora G, Sibaja G. 2011; 7(17-31).

80. Barrera JL, Arrazola GS, Cayón S DG. Caracterización fisicoquímica y fisiológica del proceso de maduración de plátano Hartón (Musa AAB Simmonds) en dos sistemas de producción. ACTA AGRONÓMICA. 2010; 59 (1)(20-29).

81. De Souza C, Costa L. Amadurecimiento de banana-prata climatizada en diferentes días apos colheita. Brasil:; 2004.

82. Memnune S, Engu L, Erkaka T, Mustafa S, Yildiz H. The effect of adding sour cherry pulp into yoghurt on the physicochemical properties, phenolic content and antioxidant activity during storage. Journal of Dairy Technology. 2012; 65(8).

83. Agarwal S, Prasad. Effect of Stabilizer on Sensory Characteristics and Microbial Analysis of Low-fat Frozen Yoghurt Incoporated with Carrot Pulp. International Journal of Agriculture and Food Science Technology. 2013 Aug; 4(797-806).

84. Mulono A, Supriyanto , Harmayanil E. Asian J. Dairy & Food Res. 2016; 35 (2) (160-163).

85. Thompson , Miller K, Lopez A. Cocoa and coffee. In: Doyle MP, Beuchat MP, Montville TJ. Food microbiologu, fundamentals and frotiers. Washington, DC: American Society for Microbiology. 2001; 2da Ed.(721-733).

86. Senanayake M, Jansz E, Buckle K. Effect of different mixing Intervals on the fermentatio of cocoa beans. Sci Food Agric. 1997; 74(42 – 48).

87. Biehl B, Passern D. Proteolysis during fermentation-like incubation of cocoa seeds. Journal of the Science of Food and Agriculture. 1982 December; 33(1280–1290).

88. Wills R, McGlasson B, Graham D, Joyce D. Postharvest: An Introduction to the Physiology & Handling of Fruit, Vegetables & Ornamentals,. In.: 4h Edition; 1998. p.

25.

89. Lagunes-Galvez S, Loiseau G, Paredes J, Barel M, Guiraud J. Study on the microflora and biochemistry of cocoa fermentation in the Dominican Republic. International Journal of Food Microbiology. 2007; 114(124-130).

90. García P. Caracterización microbiana, bioquímica y cinética del proceso de fermentación tradicional durante el beneficio de cacao. Tesis para obtener el grado de maestro en Ingeniería Química. Mexico:, Departamento de Ingeniería de Procesos e Hidráulica Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa; 2000.

91. García-Alamilla P, Salvador B, Ramos T, Bautista E, Sol S, Urrieta-Saltijeral J, et al. Cinética de acidez volátil a través del proceso de fermentación y secado de cacao. In Memorias in extenso del 111 Encuentro Internacional de Biotecnología UPIBI2002; 2002; Querétaro. p. 107-116.

92. Cornejo F, Campuzano A, Ruiz O, Peralta E. Efecto del Tipo de Producción de Banano Cavendish en su Comportamiento Poscosecha. Guayaquil, Ecuador: Escuela Superior Politécnica del Litoral, Centro de Investigaciones Biotecnológicas del Ecuador.

93. Armijos. Características de la acidez como parámetro químico de Calidad en muestras de cacao (Theobroma cacao L.) fino y ordinario de producción nacional durante la fermentación. Tesis de Lic. en Químicas. Quito EC: Pontifica Universidad Católica del Ecuador; 2002.

94. Jinap S, Ikrawan Y, Bakar J, Saari N, Lioe HN. Aroma Precursors and Methylpyrazines in Underfermented Cocoa Beans Induced by Endogenous Carboxypeptidase. Journal of Food Science. 2008; 73(141-147).

95. Holm CS, Aston JW, Keith D. The effects of the organic acids in cocoa on the flavour of chocolate. Journal of Science the Food and Agriculture. 1993; 61(65-71).

96. Marriott J, Robinson M, Karikari SK. Starch and sugar transformation during ripening

of plantains and bananas. Trop. Sci. 1981; 32(1021-1026).

97. Dadzie , Orchard. Evaluacion rutinaria de postcosecha de hibridos de platano y banano: criterios y metodos. INIFAB. 2008. p 75.

98. Schawn , A R, R B. Microbial fermentation of cacao beans, with emphasis on enzymatic degradation of the pulp. Journal of Applied Bacteriology Symposium Supplement. 1995; 79(96-107).

99. Rohan T, Stewart T. The precursors of chocolate aroma: changes in the sugars during the roasting of cocoa beans. J. Food Sci. 1966; 31(206–215).

100. Sánchez Campuzano. Caracterización organoléptica del cacao (Theobroma cacao L.), para la selección de árboles con perfiles de sabor de interés comercial. Tesis de grado para la obtencion de Ingeniero Agronomo. Quevedo- Ecuador: Universidad Tecnica Estatal de Quevedo, Facultad de Agronomia; 2007.

101. Misnawi S, Nazamid S, Jamilah B. Activation of remaining key enzymes in dried under-fermented cocoa beans and its effects on aroma precursors formation. Food Chem. 2002; 78(407–417).

CAPÍTULO VII

ANEXOS

7.1. Anexos.

7.1.1. Análisis de varianza de las variables en estudio.

Anexo 1. Cuadrado medio de levaduras.

Fuente	DF	24H	48H	72H
Híbridos	**3**	696068072361	9.4511788E12	4.5374966E12
Musáceas	**1**	1.0976682E12	714610125000	7.8467411E12
Híbridos* Musáceas	**3**	713712485694	8.6576441E12	435826708333
CV%		11.18	22.24	18.81

Anexo 2. Cuadrado medio de bacterias acido lácticas.

Fuente	DF	24H	48H	72H
Híbridos	**3**	798845570556	8.0066757E12	551246456174
Musáceas	**1**	19012500000	475149932653	3.277867E12
Híbridos* Musáceas	**3**	536471824074	6.4327958E12	5.8740981E12
CV%		14.86	24.43	32.59

Anexo 3. Cuadrado medio de bacterias acido acéticas.

Fuente	DF	24H	48H	72H
Híbridos	**3**	996875864352	4.0721308E12	1.7420342E12
Musáceas	**1**	1.4111996E12	6.6427081E12	2.2438448E12
Híbridos* Musáceas	**3**	2.2260923E12	4.080078E12	2.2438448E12
CV%		12.38	24.50	29.46

Anexo 4. Cuadrado medio de pH.

Fuente	DF	24H	48H	72H
Híbridos	**3**	0.25018333	0.08841146	0.14645833
Musáceas	**1**	1.06580000	0.07507812	0.01805000
Híbridos* Musáceas	**3**	0.06815000	0.02310313	0.04682500
CV%		4.60	5.57	3.25

Anexo 5. Cuadrado medio de temperatura.

Fuente	DF	24H	48H	72H
Híbridos	**3**	0.06697917	0.62458333	3.32416667
Musáceas	**1**	0.00781250	2.20500000	0.66125000
Híbridos* Musáceas	**3**	0.20364583	1.05833333	0.72208333
CV%		0.83	3.03	2.47

Anexo 6. Cuadrado medio de acidez titulable.

Fuente	DF	24H	48H	72H
Híbridos	**3**	0.03730313	0.02701146	0.00977813
Musáceas	**1**	0.00340312	0.01240313	0.00812812
Híbridos* Musáceas	**3**	0.00910313	0.01677813	0.02320312
CV%		9.31	7.64	8.34

Anexo 7. Cuadrado medio de Grados Brix.

Fuente	DF	24H	48H	72H
Híbridos	**3**	13.3453125	39.1353125	5.0379167
Musáceas	**1**	158.8653125	39.3828125	120.9012500
Híbridos* Musáceas	**3**	3.8461458	7.4711458	4.5912500
CV%		6.84	14.40	16.39

Anexo 8. Cuadrado medio de porcentaje de fermentación.

Fuente	DF	GF
Híbridos	**3**	313.0312500
Musáceas	**1**	38.2812500
Híbridos* Musáceas	**3**	11.5312500
CV%		7.67

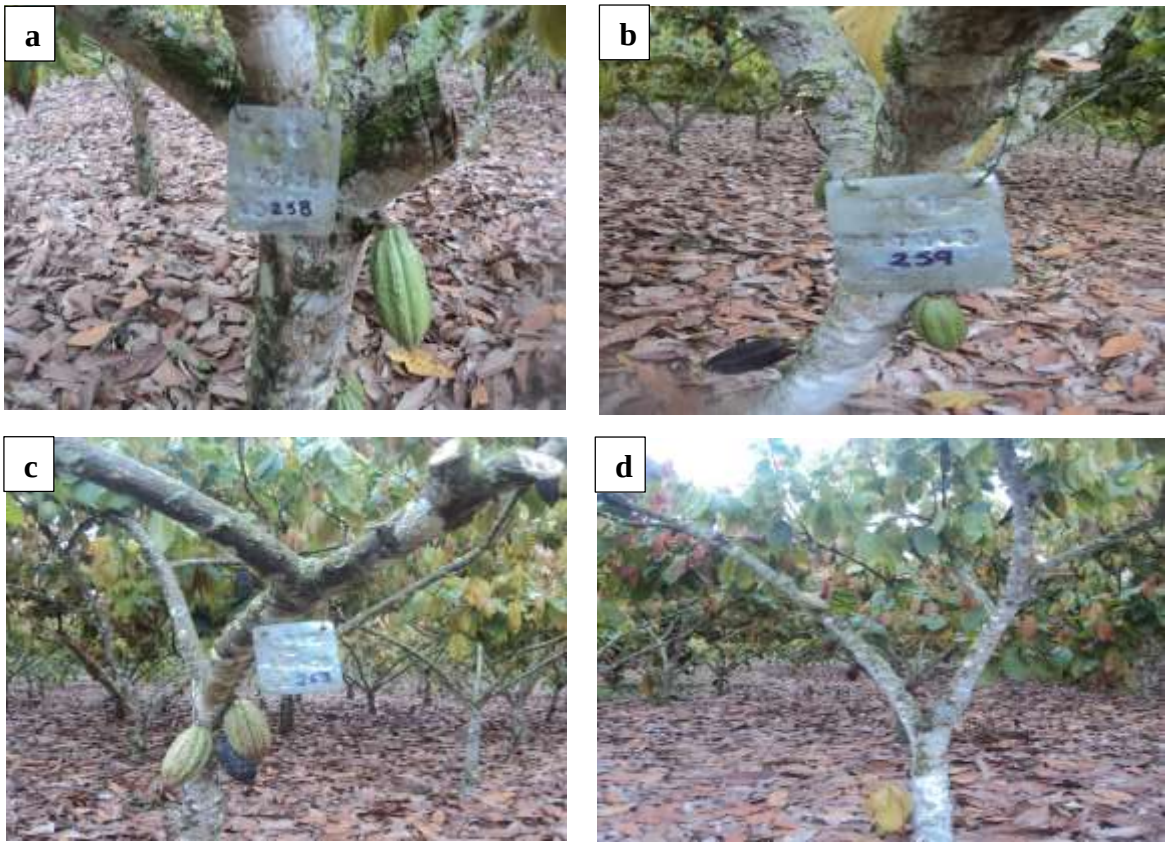
Anexo 9. Análisis físicos y químicos de las musáceas utilizadas durante el ensayo.

Componentes	pH	Temperatura ºC	Grados Brix (%)	Acidez titulable (%)
Puré de banano	4.65	25.10	21.2	0.27
Puré de plátano	4.42	25.40	33.4	0.64

Anexo 10. Análisis físicos y químicos de lo híbridos utilizadas durante el ensayo.

Componentes	pH	Temperatura ºC	Grados Brix (%)
DIRCYT- 259	4.01	23.6	8.8
DIRCYT- 259	3-37	24.2	11.2
DIRCYT- 263	3.40	24.6	11.9
DIRCYT- 265	3.44	25.0	13.4

Anexo 11. Imágenes de la investigación en el campo.



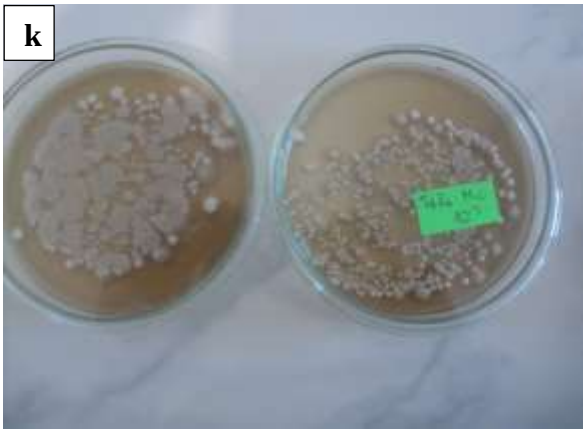
Materiales utilizados, (a) Hibrido Dircyt- 258; (b) Hibrido Dircyt- 259; (c) Hibrido Dircyt- 263;(d) Hibrido Dircyt- 265.

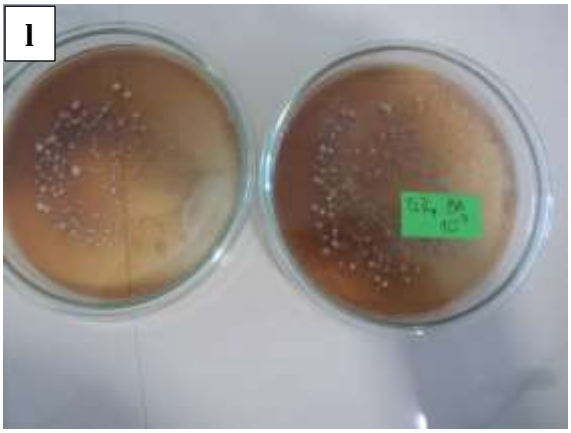
Cosecha de cacao de los materiales (e); Adición de la masa de musáceas al proceso de fermentación (f).

Anexo 12. Imágenes de la investigación en el laboratorio (RUMEN)

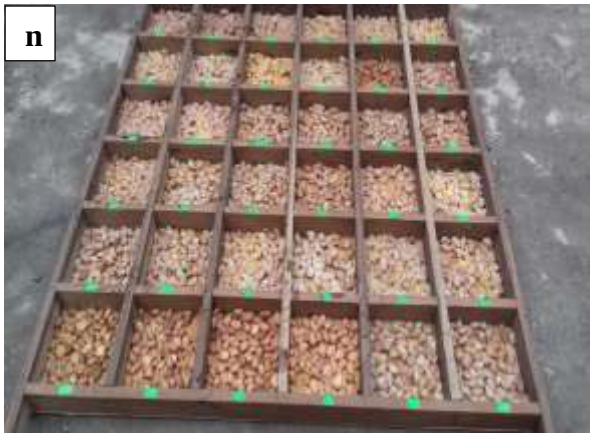
Recipiente colocados en la microfermentadora (g); Preparación de medios (f).

Cajas Petri con el medio de solución solidificadas (i); Análisis de acidez titulable en las almendras de cacao (f).





Levaduras obtenidas con disolución 10^{-3} (k); Bacterias ácido acéticas obtenidas con disolución 10^{-3} (l).



Bacterias ácido lácticas obtenidas con disolución 10^{-3} (m), colocación del cacao para el secado (n).

Prueba de corte en las almendras de cacao (o), colocación de las almendras para categorizar según su grado de fermentación (p).

Anexo 13.Norma técnica INEN 176:2006

INEN

INSTITUTO ECUATORIANO DE NORMALIZACIÓN

Quito - Ecuador

NORMA TÉCNICA ECUATORIANA NTE INEN 176:2006
Cuarta Revisión

CACAO EN GRANO. REQUISITOS.

Primera Edición

COCOA BEANS . SPECIFICATIONS.

First Edition

DESCRIPTORES: Productos agrícolas, cacao en grano, requisitos.
AL.02.06-401
CDU: 633
CIIU: 1150
ICS: 67.140.30

Anexo 14. Norma técnica INEN 1 529-10:98

INEN

INSTITUTO ECUATORIANO DE NORMALIZACIÓN

Quito - Ecuador

NORMA TÉCNICA ECUATORIANA NTE INEN 1 529-10:98

CONTROL MICROBIOLÓGICO DE LOS ALIMENTOS. MOHOS Y LEVADURAS VIABLES. RECUENTOS EN PLACA POR SIEMBRA EN PROFUNDIDAD.

Primera Edición

FOODS MICROBIOLOGICAL CONTROL. MOLDS AND YASTS. PPLATE ACCOUNT BY DEEP SOWING.

First Edition

DESCRIPTORES: Productos alimenticios, análisis microbiológico, conteje, mohos y levaduras.
AL 01.05-308
CDU: 614.31:579.67:582.28
CIIU: 9320
ICS: 07.100.30