UNIVERSIDAD ESTATAL DE BOLÍVAR

FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS, RECURSOS NATURALES Y DEL AMBIENTE

CARRERA DE AGROINDUSTRIAS

TEMA:

POTENCIACIÓN DEL BIOPROCESO DE FERMENTACIÓN DE CACAO (*Theobroma cacao* L.) MEDIANTE LA INOCULACIÓN DE BACTERIAS ÁCIDO LÁCTICAS Y ACÉTICAS PARA POTENCIAR SU CALIDAD FINAL.

Proyecto de investigación previo a la obtención del título de Ingeniero Agroindustrial otorgado por la Universidad Estatal de Bolívar a través de la Facultad de Ciencias Agropecuarias, Recursos Naturales y del Ambiente, Carrera de Agroindustrias.

AUTORES:

Pazmiño Vallejo Rommel Aaron

Troya Carrera Dayana Belén

TUTOR:

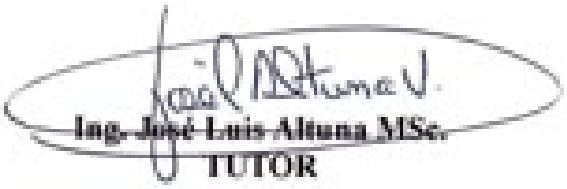
Ing. José Luis Altuna MSc.

Guaranda – Ecuador

2024

POTENCIACIÓN DEL BIOPROCESO DE FERMENTACIÓN DE CACAO (*Theobroma Cacao* L.) MEDIANTE LA INOCULACIÓN DE BACTERIAS ACIDO LÁCTICAS Y ACÉTICAS PARA POTENCIAR SU CALIDAD FINAL.

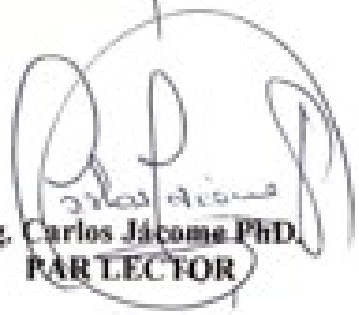
REVISADO Y APROBADO POR:



Ing. José Luis Altuna MSc.
TUTOR



Ing. Fabián Bayas PhD.
PAR LECTOR



Ing. Carlos Jácome PhD.
PAR LECTOR

CERTIFICADO DE AUTORÍA

Yo Rommel Aaron Pazmiño Vallejo, con cedula de identidad: 1723204515 y Dayana Belén Troya Carrera, con cedula de identidad 0503879405, declaro que el trabajo y los resultados presentados en este informe, no han sido previamente presentados para ningún grado o calificación profesional y que las referencias bibliográficas que se incluyen, han sido consultadas y citadas con sus respectivos autores.

La Universidad Estatal de Bolívar, puede hacer uso de los derechos de publicación correspondientes a este trabajo, según lo establecido por la ley de propiedad intelectual, su reglamento y la normativa institucional vigente.



Ing. José Luis Altuna MSc.
CI: 1802538056
e-mail: jaltuna@ueb.edu.ec
Teléfono: 0992699468

Rommel Pazmiño
CI: 1723204515
e-mail: ropazmino@mailes.ueb.edu.ec
Teléfono: 095999698

Belén Troya
CI: 0503879405
e-mail: dtroya@mailes.ueb.edu.ec
Teléfono: 0986072049

rio...

N° ESCRITURA: 202402010O3P02062

DECLARACION JURAMENTADA

OTORGADA POR: PAZMIÑO VALLEJO ROMMEL AARON, y,

TROYA CARRERA DAYANA BELEN

SECAIRA CHACAN DARNELY ANDREINA

INDETERMINADA DI: 2 COPIAS

H.R. Factura: 001-006- 000006569

En la ciudad de Guaranda, capital de la provincia Bolívar, República del Ecuador, hoy día seis de Agosto del dos mil veinticuatro, **ante mi Abogado HENRY ROJAS NARVAEZ, Notario Público Tercero del Cantón Guaranda,** comparecen **PAZMIÑO VALLEJO ROMMEL AARON**, soltero, de ocupación estudiante, domiciliado en el barrio Nuevo Guanujo del Cantón Guaranda Provincia Bolívar, (0959996987), su correo electrónico rommelito2007@hotmail.com , y, **TROYA CARRERA DAYANA BELEN,** soltera, de ocupación estudiante, domiciliada en el Cantón San Miguel de Salcedo de la Provincia de Cotopaxi y de paso por este lugar, con celular número (0986072049), su correo electrónico es daybelen57@gmail.com, por sus propios y personales derechos, obligarse a quienes de conocerles doy fe en virtud de haberme exhibido sus documentos de identificación y con su autorización se ha procedido a verificar la información en el Sistema Nacional de Identificación Ciudadana; bien instruida por mí el Notario con el objeto y resultado de esta escritura pública a la que proceden libre y voluntariamente, advertido de la gravedad del juramento y las penas de perjurio, me presentan su declaración Bajo Juramento declaran lo siguiente manifestamos que el criterio e ideas emitidas en el presente trabajo de investigación titulado **POTENCIACIÓN DEL BIOPROCESO DE FERMENTACIÓN DE CACAO *(Theobroma cacao* L.*)* MEDIANTE LA INOCULACIÓN DE BACTERIAS ÁCIDO LÁCTICAS Y ACÉTICAS PARA POTENCIAR SU CALIDAD FINAL** es de nuestra exclusiva responsabilidad en calidad de autores, previo a la obtención del título de Ingenieros en Agroindustrias, de la Facultad de Ciencias Agropecuarias, Recursos Naturales y del Ambiente, en la Universidad Estatal de Bolívar. Es todo cuanto podemos declarar en honor a la verdad, la misma que hacemos para los fines legales pertinentes. **HASTA AQUÍ LA DECLARACIÓN** JURADA. La misma que elevada a escritura pública con todo su valor legal. Para el otorgamiento de la presente escritura pública se observaron todos los preceptos legales del caso, leída que les fue a los comparecientes por mí el Notario en unidad de acto, aquellos se ratifican quedando incorporado al protocolo de esta notaria y firman conmigo de todo lo cual doy Fe.

PAZMIÑO VALLEJO ROMMEL AARON

C.C. 1723204515

TROYA CARRERA DAYANA BELEN

C.C. 0503879405

AB. HENRY ROJAS NARVAEZ

NOTARIO PUBLICO TERCERO DEL CANTON GUARANDA

EL NOTA...

NOMBRE DEL TRABAJO

Tesis final Troya y Pazmiño.pdf

AUTOR

Belen Troya

RECUENTO DE PALABRAS

21336 Words

RECUENTO DE CARACTERES

112254 Characters

RECUENTO DE PÁGINAS

129 Pages

TAMAÑO DEL ARCHIVO

3.1MB

FECHA DE ENTREGA

Jul 25, 2024 11:52 AM GMT-5

FECHA DEL INFORME

Jul 25, 2024 11:55 AM GMT-5

10% de similitud general

El total combinado de todas las coincidencias, incluidas las fuentes superpuestas, para cada base de datos.

- 9% Base de datos de Internet
- 5% Base de datos de publicaciones
- Base de datos de Crossref
- Base de datos de contenido publicado de Crossref

Excluir del Reporte de Similitud

- Base de datos de trabajos entregados
- Fuentes excluidas manualmente
- Bloques de texto excluidos manualmente



Dedicatoria

ROMMEL PAZMIÑO

Dedico esta tesis con todo mi amor y gratitud a mi padre, el Dr. Romel Pazmiño que ha sido mi mayor ejemplo y el que ha apoyado incondicionalmente todo este proceso educativo que culmina con este documento, a mi señora madre Consuelo Vallejo cuyo amor, apoyo incondicional y constante aliento han sido el pilar de mi perseverancia y éxito. A mi papá, por su sabiduría y fortaleza, y a mi mamá, por su amor inquebrantable y confianza en mí, les agradezco profundamente por ser mi mayor inspiración y guía a lo largo de este viaje académico.

De manera especial, quiero dedicar este trabajo a la memoria de mi abuelita, cuyo legado de amor y sabiduría sigue iluminando mi camino. Aunque ya no esté físicamente presente, su espíritu y enseñanzas continúan siendo una fuente de fortaleza y motivación para mí.

Gracias a cada uno de ustedes por su amor, apoyo y sacrificio, que han hecho posible la culminación de este esfuerzo.

Dedicatoria

BELEN TROYA

Dedico esta investigación A mi querida madre Lilia Carrera Coronado, fuente inagotable de amor y sabiduría, gracias por ser mi guía, mi apoyo incondicional y mi ejemplo de fortaleza. Tu amor incondicional es mi faro en la oscuridad y mi refugio en las tormentas. Te admiro más de lo que las palabras pueden expresar.

A mi amada hija María Paz Corrales Troya, luz radiante de mi vida, cada día contigo es un regalo del universo. Tu sonrisa ilumina mi mundo y tu curiosidad infinita me inspira a ver el mundo con nuevos ojos. Eres mi mayor orgullo y mi más grande motivación. Que siempre sepas que te amo con todo mi corazón y cuánto valoro tu presencia en mi vida.

A mis estimados docentes, guardianes del conocimiento y forjadores de mentes brillantes, su dedicación y pasión por enseñar han dejado una huella imborrable en mi camino. Gracias por abrirme las puertas del saber, por inspirarme a alcanzar mis sueños y por creer en mí incluso cuando yo dudaba de mis propias capacidades. Vuestra labor es invaluable y vuestro legado perdurará por generaciones.

Agradecimiento

ROMMEL PAZMIÑO

En primer lugar, agradezco a Dios, por ser el dador de vida, salud y guía a lo largo de este camino. Su presencia ha sido mi mayor apoyo en cada desafío y logro. A mi familia, cuyo amor incondicional y apoyo constante han sido fundamentales para la culminación de esta tesis. A mis padres, por su sacrificio y aliento, y a todos los miembros de mi familia por su comprensión y apoyo a lo largo de este proceso.

A la Fundación Maquita, por ofrecerme la oportunidad de contribuir a proyectos de gran impacto y por su respaldo en el desarrollo de esta investigación. Su compromiso con el desarrollo y la mejora de las comunidades ha sido una fuente de inspiración. Al Laboratorio de Investigación y Vinculación, por proporcionar los recursos y el entorno adecuado para llevar a cabo este estudio. Su infraestructura y orientación técnica han sido esenciales para el éxito de este trabajo.

A los ingenieros Fabián Bayas y José Luis Altuna, por su valiosa orientación y asesoramiento. Su experiencia y conocimientos han sido cruciales para la calidad y el desarrollo de esta investigación.

Finalmente, a mi novia y mis amigos del grupo La Primavera, cuyo apoyo y compañía han hecho el camino más llevadero y agradable. Su amistad y ánimo han sido una fuente constante de motivación y alegría.

A todos ustedes, mi más sincero agradecimiento.

Agradecimiento

BELÉN TROYA

Agradezco especialmente a la Asociación de Mujeres del Recinto San Gerardo con su marca CHOCOWARMI de la Provincia de Bolívar, Unión Europea (Generalitat Valenciana, Ecosol), Fundación Maquita y al VICERRECTORADO DE INVESTIGACIÓN Y VINCULACIÓN de la Universidad Estatal de Bolívar, por el patrocinio y financiamiento que se originó para la preparación y presentación de esta Investigación.

También mencionar a todos ingenieros y técnicos de nuestra prestigiosa institución que, de una forma u otra, han contribuido en nuestra formación académica y personal. Cada clase, cada enseñanza y cada conversación han dejado una huella imborrable en nuestra trayectoria universitaria.

A todos ustedes, queridos docentes amigos de la carrera de Agroindustrias, un profundo agradecimiento por su compromiso con la excelencia académica y su dedicación al crecimiento de sus estudiantes. Sin su guía y aliento, esta tesis no habría sido posible.

¡Gracias!

ÍNDICE

Nº **DETALLE** **PAG.**

CAPITULO I.....1

1.1. INTRODUCCIÓN.....1

1.2. PROBLEMA.....2

1.3. OBJETIVOS.....3

1.3.1. Objetivo General.....3

1.3.2. Objetivos específicos.....3

1.4. Hipótesis.....3

1.4.1. Hipótesis Nula.....3

1.4.2. Hipótesis Alterna.....3

CAPITULO II.....4

2. MARCO TEÓRICO.....4

2.1. Cacao *(Theobroma Cacao L.)*.....4

2.2. Principales variedades de cacao utilizadas en Ecuador.....4

2.2.1. Nacional.....4

2.2.2. CCN-51.....4

2.3. Calidad del cacao.....4

2.4. Composición del cacao.....4

2.4.1. Pulpa.....5

2.4.2. Cotiledón.....5

2.5. Principales compuestos bioactivos del cacao.....5

2.5.1. Polifenoles.....5

2.5.2. Cafeína y Teobromina.....5

2.6. Fermentación.....5

2.6.1. Fase Anaerobia.....6

2.6.2. Fase Aeróbica.....6

2.7. Sustrato para potenciar aroma y sabor en la fermentación 7
2.7.1. *Acetobacter* spp 8
2.7.2. *Lactobacillus* spp 8
2.7.3. Suero de leche 8
CAPÍTULO III 9
3.1. MARCO METODOLÓGICO 9
3.1.1. Ubicación de la investigación 9
3.1.1.1. Localización de la Investigación 9
3.1.1.2. Zona de Vida 9
3.1.2. Materiales 9
3.1.2.1. Material experimental 9
3.1.2.2. Materiales de laboratorio 10
3.1.2.3. Reactivos 11
3.1.2.4. Equipos 11
3.1.3. Metodología 12
3.1.3.1. Factores de estudio 12
3.1.3.1.1. Modelo 1 Aplicado para el sustrato con Acetobacter spp 12
3.1.3.1.2. Modelo 2 Aplicado para el sustrato con Lactobacillus spp 12
3.1.3.1.3. Modelo 3 Aplicado para la fermentación 12
3.1.3.2. Tratamientos 13
3.1.3.3. Descripción de las unidades experimentales 14
3.1.3.3.1. Descripción de la unidad experimental modelo 1 14
3.1.3.3.2. Descripción de la unidad experimental modelo 2 15
3.1.3.3.3. Descripción de la unidad experimental modelo 3 15
3.1.3.4. Tipos de diseño experimental 16
3.1.3.4.1. Modelo 1 y 2 (Diseño experimental AXB) 16
3.1.3.4.2. Modelo de Análisis de varianza (ANOVA) para el diseño AxB 16
3.1.3.4.3. Modelo de la prueba de Rangos Múltiples del diseño AXB 16
3.1.3.4.4. Modelo 3 (Diseño experimental AXBXC) 17

3.1.3.4.5. Modelo de Análisis de varianza (ANOVA) para el diseño AxBxC ……17
3.1.3.4.6. Modelo de la prueba de Rangos Múltiples..... 18
3.1.4. Manejo del experimento..... 18
3.1.4.1. Selección, cosecha y post cosecha del cacao 18
3.1.4.2. Caracterización de la materia prima (físico químico) 19
3.1.4.2.1. Acidez titulable 19
3.1.4.2.1.1. Determinación de acidez de mucilago de cacao..... 19
3.1.4.2.1.2. Para la determinación de Acidez de Almendras de Cacao . 20
3.1.4.2.1.3. Para la determinación de acidez de Suero de Leche..... 21
3.1.4.2.2. Potencial de hidrogeno (pH) 21
3.1.4.3. Caracterización de la materia prima (proximal)..... 21
3.1.4.3.1. Grasa 21
3.1.4.3.2. Proteína 22
3.1.4.3.3. Humedad 23
3.1.4.3.4. Cenizas 23
3.1.4.3.5. Material volátil 24
3.1.4.4. Preparación del sustrato 24
3.1.4.5. Caracterización de los inóculos (Suero+ *Acetobacter spp* y Suero + *Lactobacillus spp*) 25
3.1.4.5.1. Tinción de Gram 25
3.1.4.5.2. Prueba de catalasa 26
3.1.4.5.3. Conteo de bacterias del sustrato (UFC/ml) 26
3.1.4.6. Fermentación de cacao Nacional y CCN-51 en laboratorio..... 27
3.1.4.7. Fermentación de los mejores resultados en el recinto San Gerardo ……29
3.1.4.8. Preparación de la pasta de cacao 30
3.1.4.8.1. Determinación alcaloides (cafeína y teobromina), polifenoles totales y grasa de la pasta de cacao 33
3.1.4.8.2. Cafeína 33
3.1.4.8.3. Teobromina 33
3.1.4.9. Determinación de polifenoles totales 33

3.1.4.10. Grasa 34

CAPITULO IV 35

4.1. RESULTADOS Y DISCUCIÓN 35

4.1.1. Caracterización físico-química y proximal de la materia prima 35

4.1.1.1. Cacao 35

4.1.1.2. Mucílago 35

4.1.1.3. Suero de leche 36

4.1.2. Elaboración de los inóculos Modelo 1 y 2 37

4.1.2.1. Modelo 1 (Suero+ *Acetobacter spp*) 37

4.1.2.1.1. Análisis de Varianza para pH 38

4.1.2.1.2. Análisis de Varianza para grados Brix 38

4.1.2.1.3. Análisis de varianza para Conteo de Colonias 39

4.1.2.2. Modelo 2 (Suero + *Lactobacillus spp*) 39

4.1.2.2.1. Análisis de Varianza para pH 40

4.1.2.2.2. Pruebas de Múltiple Rangos para pH por Suero + Lactobacillus spp 40

4.1.2.2.3. Análisis de Varianza para grados Brix 42

4.1.2.2.4. Pruebas de Múltiple Rangos para grados Brix por (Suero + Lactobacillus spp) 42

4.1.2.2.5. Análisis de Varianza para Conteo de colonias 44

4.1.2.2.6. Pruebas de Múltiple Rangos para Conteo de colonias por (Suero + Lactobacillus) 44

4.1.2.2.7. Pruebas de Múltiple Rangos para Conteo de colonias por Tiempo 45

4.1.3. Caracterización de los inóculos 46

4.1.3.1. Modelo 1 (Suero+ *Acetobacter spp*) 46

4.1.3.1.1. Modelo 2 (Suero + *Lactobacillus spp*) 47

4.1.3.2.1 Tinción de Gram 47

4.1.3.2.2. Prueba de Catalasa 48

4.1.3.2.3. Conteo Bacteriano (UFC/ml) 48

4.1.4. Modelo 3 (Fermentación de cacao CCN-51 y nacional en laboratorio) ……48
4.1.4.1. Análisis de Varianza para pH..... 50
4.1.4.2. Pruebas de Múltiple Rangos para pH por Variedad de Cacao..... 50
4.1.4.3. Pruebas de Múltiple Rangos para pH por Tiempo..... 51
4.1.4.4. Análisis de Varianza para grados Brix..... 53
4.1.4.5. Pruebas de Múltiple Rangos para grados brix por Tipo de sustrato ……53
4.1.4.6. Pruebas de Múltiple Rangos para grados Brix por Tiempo..... 54
4.1.4.7. Análisis de Varianza para Color de almendra..... 56
4.1.4.8. Pruebas de Múltiple Rangos para Color de almendra por Tipo de sustrato ……56
4.1.5. Análisis de fermentación a escala laboratorio de cacao (Nacional y CCN-51) ……58
4.1.5.1. Prueba de corte..... 58
4.1.5.2. Humedad..... 59
4.1.6. Fermentación de los mejores resultados en el recinto San Gerardo.. 60
4.1.7. Resultados (alcaloides, polifenoles y grasa) de la pasta de cacao..... 62
4.1.7.1. Polifenoles..... 63
4.1.7.2. Alcaloides..... 64
4.1.7.2.1. Teobromina..... 64
4.1.7.2.2. Cafeína..... 64
4.1.7.3. Grasa..... 65
4.2. COMPROBACIÓN HIPÓTESIS 66
4.2.1. Hipótesis Nula..... 66
4.2.2. Hipótesis Alterna..... 66
4.2.3. Comprobación de la hipótesis..... 66
CAPITULO V 67
5.1. CONCLUSIONES 67

5.2. RECOMENDACIONES 69

BIBLIOGRAFÍA 70

ANEXOS 76

ÍNDICE DE TABLAS

Nº **DETALLE** **PAG.**

Tabla 1 Principales microorganismos durante el tiempo de fermentación del cacao 7
Tabla 2 Localización de la investigación 9
Tabla 3 Zona de vida 9
Tabla 4 Equipos 11
Tabla 5 Tabla de factores modelo 1 12
Tabla 6 Tabla de factores modelo 2 12
Tabla 7 Tabla de factores modelo 3 13
Tabla 8 Tabla de tratamientos modelo 1 13
Tabla 9 Tabla de tratamientos modelo 2 13
Tabla 10 Tabla de tratamientos modelo 3 14
Tabla 11 Tabla de características del diseño experimental modelo 1 14
Tabla 12 Tabla de características del diseño experimental modelo 2 15
Tabla 13 Tabla de características del diseño experimental modelo 3 15
Tabla 14 Modelo de análisis de varianza (ANOVA) para el diseño en arreglo factorial AxB 16
Tabla 15 Modelo de análisis de varianza (ANOVA) para el diseño en arreglo factorial AxBxC 17
Tabla 16 Combinaciones de sustratos aplicados al experimento de fermentación 28
Tabla 17 Diseño muestral de la fermentación de cacao en el recinto San Gerardo 29
Tabla 18 Análisis físico-químico y proximal para almendra de cacao (CCN-51 y Nacional). 35
Tabla 19 Análisis físico-químico y proximal para el mucílago de cacao CCN-51 y Nacional 36
Tabla 20 Caracterización físico - químico y proximal del suero de leche 36
Tabla 21 Tratamientos para el sustrato a base de Suero de leche con Acetobacter spp. 37

Tabla 22 Análisis de Varianza para pH a base de Suero de leche con Acetobacter spp 38
Tabla 23 Análisis de Varianza para grados Brix a base de Suero de leche con Acetobacter spp. 38
Tabla 24 Análisis de Varianza para conteo de colonias a base de Suero de leche con Acetobacter spp. 39
Tabla 25 Tratamientos para el sustrato a base de Suero de leche con Lactobacillus spp. 39
Tabla 26 Análisis de Varianza para pH a base de Suero de leche con Lactobacillus spp. 40
Tabla 27 Método: 95,0 porcentaje LSD para pH por Suero + Lactobacillus..... 40
Tabla 28 Análisis de Varianza para grados Brix a base de Suero de leche con Lactobacillus spp..... 42
Tabla 29 Método: 95,0 porcentaje LSD para grados Brix por Suero + Lactobacillus 42
Tabla 30 Análisis de Varianza para Conteo de colonias a base de Suero de leche con Lactobacillus spp. 44
Tabla 31 Método: 95,0 porcentaje LSD para Conteo de colonias por Suero + Lactobacillus 44
Tabla 32 Método: 95,0 porcentaje LSD para Conteo de colonias por Tiempo... 45
Tabla 33 Conteo bacteriano Modelo 2 48
Tabla 34 Tratamientos para el proceso de fermentación a escala laboratorio 48
Tabla 35 Análisis de Varianza para pH en el proceso de fermentación..... 50
Tabla 36 Método: 95,0 porcentaje LSD para pH por Variedad de Cacao 50
Tabla 37 Método: 95,0 porcentaje LSD para pH por Tiempo 51
Tabla 38 Análisis de Varianza para grados Brix en el proceso de fermentación 53
Tabla 39 Método: 95,0 porcentaje LSD para grados brix por Tipo de sustrato en el proceso de fermentación 53
Tabla 40 Método: 95,0 porcentaje LSD para grados Brix por Tiempo..... 54
Tabla 41 Análisis de Varianza para conteo de colonias en el proceso de fermentación..... 56
Tabla 42 Método: 95,0 porcentaje LSD 56

Tabla 43 Tabla de corte de grano de los mejores resultados obtenidos en laboratorio. 58
Tabla 44 Tabla de humedad (inicial y final) de las muestras fermentadas a escala laboratorio. 59
Tabla 45 Manejo del experimento a escala piloto 60
Tabla 46 Monitoreo fermentación hora 0 61
Tabla 47 Monitoreo de la fermentación hora 72, 24 horas después de la adición del sustrato 61
Tabla 48 Monitoreo de la fermentación hora 168, finalización de la fermentación 61
Tabla 49 Análisis de polifenoles de la pasta de cacao 63
Tabla 50 Análisis de Teobromina de la pasta de cacao 64
Tabla 51 Análisis de Cafeína de la pasta de cacao 64
Tabla 52 Análisis de grasa de la pasta de cacao 65

ÍNDICE DE FIGURAS

Nº **DETALLE** **PAG.**

Figura 1 Diagrama de Beneficio de cacao 19
Figura 2 Diagrama de preparación de sustrato 25
Figura 3 Diagrama de proceso de elaboración de pasta de cacao. 32
Figura 4 Gráfica de medias para suero + Lactobacillus en función a pH 41
Figura 5 Gráfico de interacciones entre (Suero + Lactobacillus) para pH..... 41
Figura 6 Gráfica de medias para Suero + Lactobacillus en función a grados Brix 43
Figura 7 Gráfica de medias para Suero + Lactobacillus en función a grados Brix 43
Figura 8 Gráfica de medias para suero + Lactobacillus en función a Conteo de colonias 45
Figura 9 Gráfico de interacciones entre (Suero + Lactobacillus), conteo de colonias y tiempo..... 46
Figura 10 Placas con medio GYC sembradas con sustrato Modelo 1 (Suero + Acetobacter spp)..... 46
Figura 11 Caracterización mediante tinción de Gram al sustrato a base de suero de leche adicionado Lactobacillus spp..... 47
Figura 12 Caracterización de Lactobacillus por tinción de Gram 47
Figura 13 Gráfica de medias pH por variedad de cacao en el proceso de fermentación..... 51
Figura 14 Gráfica de pH por tiempo en el proceso de fermentación 52
Figura 15 Gráfico de interacciones variedad de cacao por tipo de sustrato en relación a pH 52
Figura 16 Gráfico de medias grados Brix por tipo de sustrato en el proceso de fermentación..... 54
Figura 17 Gráfico de medias grados Brix por tiempo en el proceso de fermentación 55
Figura 18 Gráfica de interacciones entre variedad de cacao y grados Brix 55
Figura 19 Gráfico de medias color de la almendra por tipo de sustrato en el proceso de fermentación..... 57

Figura 20 Gráfico de interacciones variedad de cacao por tipo de sustrato en relación a color de la almendra 57

ÍNDICE ANEXOS

1 Ubicación de la investigación

2 Presupuesto

3 Certificados análisis INIAP

4 Informe de resultados de humedad y volátiles análisis del Laboratorio de Investigación y Vinculación de la UEB

5 Análisis de proteína por parte del Laboratorio de Investigación y Vinculación de la UEB.

6 Anexos de imágenes

7 Glosario de términos

RESUMEN

El estudio se enfocó en mejorar la calidad de la pasta de cacao, abordando diferentes etapas del proceso, empezando en la selección y caracterización de la materia prima, finalizando en la fermentación y procesamiento final. Se utilizó como sustrato suero de leche para la fermentación del cacao, encontrando que la adición de inóculos de *Lactobacillus spp*. resultó en mejoras significativas en términos de aroma y sabor para la fermentación. Estos hallazgos fueron respaldados por análisis sensoriales positivos que destacaron aromas a yogur, caramelo y leche en las muestras tratadas con este sustrato.

Los análisis (determinación de alcaloides, polifenoles y grasa) de la pasta de cacao obtenida en la fermentación realizada en el recinto San Gerardo, revelaron resultados destacables. En términos de polifenoles, se observó que la muestra que utilizó cacao Nacional sin sustrato presentó el mayor contenido con 89,58 mg A. gálico/g, seguido por la muestra que combinó CCN-51 con un 10% de suero y un 0,5% de *Lactobacillus spp*. con 85,34 mg A. gálico/g. Se observo, disminución en cantidad de polifenoles, En cuanto a la teobromina, la muestra de cacao Nacional sin sustrato presentó el mayor contenido con un 2,14%, seguido por la muestra que combinó cacao Nacional con un 10% de suero y un 0,5% de *Lactobacillus spp*. con un 1,72%. Similarmente, para la cafeína, la muestra de cacao Nacional sin sustrato registró el mayor contenido con un 0,43%, seguido por la muestra que combinó cacao Nacional con un 10% de suero y un 0,5% de *Lactobacillus spp*. con un 0,39%. La disminución de polifenoles y alcaloides se traducen en disminución del amargor y astringencia, y los sabores a leche se deben al aumento de ácido láctico proveniente de bacterias acido lácticas.

Palabras clave: Fermentación de cacao; sustratos, *Lactobacillus spp*., *Acetobacter spp.*

SUMMARY

The study focused on improving the quality of cocoa paste by addressing different stages of the process, starting with the selection and characterization of the raw material and ending with fermentation and final processing. Whey was used as a substrate for cocoa fermentation, finding that the addition of Lactobacillus spp. inoculums resulted in significant improvements in aroma and flavor during fermentation. These findings were supported by positive sensory analyses that highlighted yogurt, caramel, and milk aromas in the samples treated with this substrate. The analyses (determination of alkaloids, polyphenols, and fat) of the cocoa paste obtained from the fermentation carried out at the San Gerardo site revealed remarkable results. In terms of polyphenols, it was observed that the sample using Nacional cocoa without substrate had the highest content with 89.58 mg gallic acid/g, followed by the sample combining CCN-51 with 10% whey and 0.5% Lactobacillus spp. with 85.34 mg gallic acid/g. A decrease in polyphenol content was observed. Regarding theobromine, the Nacional cocoa sample without substrate had the highest content with 2.14%, followed by the sample combining Nacional cocoa with 10% whey and 0.5% Lactobacillus spp. with 1.72%. Similarly, for caffeine, the Nacional cocoa sample without substrate recorded the highest content with 0.43%, followed by the sample combining Nacional cocoa with 10% whey and 0.5% Lactobacillus spp. with 0.39%. The decrease in polyphenols and alkaloids translates to a reduction in bitterness and astringency, and the milk flavors are due to the increase in lactic acid from lactic acid bacteria.

Keywords: Cocoa fermentation; substrates, Lactobacillus spp., Acetobacter spp.

CAPITULO I

1.1. INTRODUCCIÓN

El cacao (*Teobroma Cacao* L.) está distribuido en el planeta, a través de cultivos destinados a ese propósito, siendo así el precursor en la fabricación de pasta de cacao y sus derivados (Arvelo et al., 2019).

Actualmente, Ecuador es considerado el tercer productor cacao a nivel mundial (A. García et al., 2021), en Ecuador el cacao se produce en regiones tropicales y subtropicales, en total, 590.579 hectáreas cultivadas y 527.327 hectáreas cosechadas (INEN et al., 2020).

El chocolate, a través de la historia, ha estado presente en muchas culturas en Latinoamérica y es ingrediente de muchos productos, principalmente postres, casi 500 productos bioquímicos dan el sabor característico al chocolate, si queremos un chocolate de sabor agradable y alta calidad debemos tomar en cuenta el proceso de fermentación (Meza, 2019). Durante la fermentación la pulpa o mucilago sirve de sustrato para los consorcios microbianos presentes y si algo no es adecuado durante el proceso la calidad final del licor de cacao se verá afectada. (Meza, 2019).

Dentro de los cambios a nivel bioquímico que se dan, encontramos el color de la pulpa (cambio de blanco a café), por la presencia de compuestos fenólicos (Erazo et al., 2021). Compuestos bioquímicos como, alcaloides (cafeína y teobromina), acidez volátil (destacando el ácido acético) y polifenoles, indican calidad sensorial en la fermentación final (Rivera et al., 2012).

La producción de un sustrato con un pH adecuado y azucares reductoras necesarias para microorganismos es una alternativa viable en el mejoramiento de aroma y sabor de licor de cacao, además es una alternativa de manejo de desechos para los pequeños productores de determinada comunidad (Meza, 2019).

1.2. PROBLEMA

La calidad en la producción de licor de cacao es dependiente de características propias como palatabilidad, análisis microbiológicos, componentes bioquímicos y seguridad microbiológica (Fajardo et al., 2019), por ello es necesario una selección adecuada de métodos de análisis. Por medio de la fermentación, el cacao sufre cambios en su composición, sin embargo, la fermentación tradicional del cacao a menudo se realiza sin aditivos o mejoradores específicos, lo que limita el potencial para mejorar la calidad del producto final.

Bajo este lineamiento, surge la posibilidad para utilizar suero láctico y bacterias acido lácticas y acéticas en fermentación de cacao, para así, mejorar aroma y sabor del chocolate resultante. Sin embargo, hasta la fecha, hay escasez de información que muestre la utilización de Suero Láctico como sustrato para los microorganismos en procesos fermentativos de cacao y el mejoramiento de aroma y sabor de la pasta de cacao. Por lo tanto, surge la necesidad de abordar el siguiente problema de investigación:

¿Cómo influirá el uso de Suero Láctico como sustrato en la adición de bacterias acido lácticas y acéticas en el proceso de fermentación de cacao en función de la calidad final de la pasta de cacao?

Mediante esta investigación, se espera obtener resultados que ayuden a mejorar la fermentación de cacao. Además, se podría promover el aprovechamiento del suero láctico, contribuyendo al desarrollo productivo y económico de los habitantes del recinto San Gerardo, cantón Echeandía.

1.3. OBJETIVOS

1.3.1. Objetivo General

Potenciar el bioproceso de fermentación de cacao *(Theobroma Cacao* L), mediante la inoculación de bacterias acido lácticas y acéticas, para potenciar su calidad final.

1.3.2. Objetivos específicos

- Caracterizar almendras de cacao (Nacional y CCN-51), mucilago de cacao (Nacional y CCN-51) y suero de leche, mediante análisis físico químico y proximal.
- Elaborar un sustrato a partir de suero láctico para producir inóculos de bacterias ácido lácticas y acéticas, utilizables durante el proceso de fermentación de cacao *(Theobroma Cacao* L*.)* en laboratorio, a diferentes concentraciones para probar su efectividad.
- Probar los mejores resultados obtenidos en fermentación de cacao en el recinto San Gerardo, cantón Echeandía.
- Preparar pasta de cacao.
- Determinar alcaloides (cafeína y teobromina), polifenoles totales y grasa de la pasta de cacao obtenida para determinar su calidad final.

1.4. Hipótesis

1.4.1. Hipótesis Nula

La adición de bacterias acido lácticas y acéticas no influye en la calidad final de la pasta de cacao (*Theobroma Cacao* L.) Nacional y CCN-51.

1.4.2. Hipótesis Alterna

La adición de bacterias acido lácticas y acéticas influye en la calidad final de la pasta de cacao (*Theobroma Cacao* L.) Nacional y CCN-51.

CAPITULO II

2. MARCO TEÓRICO

2.1. Cacao *(Theobroma Cacao L.)*

El cacao es un árbol de en la zonas subtropicales y tropicales alrededor del planeta, entre las latitudes 10º Norte y 10º, su consumo data de 200 años antes de Cristo por culturas ancestrales centroamericanas como Mayas y aztecas. (El tamaño de la planta está entre 10 a 30 cm de ancho y 7 a 9 metros de alto). (A. García et al., 2021). El fruto es una baya, pero comúnmente conocido como mazorca, de acuerdo a la variedad que pertenece varia su tamaño y color. El fruto va de los 20 a 35 centímetros de largo y pesa entre 200 y 1000 gramos según su especie. (Maldonado, 2023).

2.2. Principales variedades de cacao utilizadas en Ecuador

En Ecuador, se producen principalmente dos variedades de cacao: Nacional y el clon denominado CCN-51.

2.2.1. Nacional

El cacao Nacional se clasifica botánicamente como el tipo forastero, ya que posee características de este. Tiene un sabor y aroma altamente apreciado entre los productores de chocolate. Posee un intenso aroma a jazmín y rosas y un agradable sabor (Sacoto et al., 2022).

2.2.2. CCN-51

CCN 51 es tradicionalmente reconocido como un clon trinitario con contribuciones parentales de Forastero y Criollo del bajo Amazonas, mientras que IMC-67 es un Forastero del alto Amazonas recolectado en Perú (Jaimez et al., 2022).

2.3. Calidad del cacao

La calidad del cacao depende de sus características organolépticas y sabor agradable (Sacoto et al., 2022), además de prácticas adecuadas de postcosecha, a estas se las conoce como beneficiado del cacao.

2.4. Composición del cacao

La fruta es una drupa de tamaño significativo, sujetada por un pedúnculo que proviene del pedicelo de la flor, tiene 5 lóculos, formados por 2 lomos y un surco interno. Se los clasifica por distintos genotipos en base a su forma, tamaño y color

(Sacoto et al., 2022). Describiremos las partes más importantes que comprenden este fruto.

2.4.1. Pulpa

La pulpa del cacao es conocida como mucílago, es una capa blanca y blanda que envuelve a las semillas. Conformada por células esponjosas parenquimatosas, con alto contenido de savia, ricas en azúcares (10-13%), ácido cítrico (1-2%), pentosas (2-3%) y sales (8-10%) (Hernández, 2020).

2.4.2. Cotiledón

Compuesto por un epicarpio, formado en la epidermis por tejidos ricos en parénquima; el mesocarpio, una zona angosta con sus respectivos canales de mucilago, donde están 5 haces vasculares principales y 5 secundarios formando la estructura del fruto y el endocarpio, el mismo que es delgado, parenquimatoso y de paredes internas duras y brillantes (Medina, 2020).

2.5. Principales compuestos bioactivos del cacao

2.5.1. Polifenoles

Compuestos por una estructura que presenta de uno o más anillos fenólicos. Son propios de las plantas que los sintetizan como metabolitos secundarios para funciones fisiológicas y otros como sustancias de defensa. Existen diferencias en función de sus anillos y de los compuestos presentes en los anillos. Los más destacados son: ácidos fenólicos (derivados del *ácido hidroxibenzoico* o del *ácido hidroxicinamico*), *estilbenos, lignanos, alcoholes fenólicos* y *flavonoides* (Moran, 2016).

2.5.2. Cafeína y Teobromina

La cafeína (1*,3,7-trimetilxantina*) y la teobromina (*3,7- dimetilxantina* pertenecen al grupo de las xantinas, que pertenecen a las purinas. Desde una perspectiva farmacológica, son psicoestimulantes (Lozano et al., 2019).

2.6. Fermentación

Etapa en el procesamiento del cacao donde se dan origen a los precursores de aroma y sabor (Erazo et al., 2021). Dentro de los cambios más significativos que podemos encontrar es el cambio de color de la pulpa de blanco a marrón por los compuestos fenólicos (Erazo et al., 2021). Los precursores sensoriales como, alcaloides (cafeína

y teobromina), polifenoles y ácidos orgánicos como el acético son los mejores indicadores de aroma y sabor. (Rivera et al., 2022).

El cacao experimenta 2 fases de fermentación, una anaeróbica y una aeróbica que se detallan a continuación.

2.6.1. Fase Anaerobia

La fermentación anaeróbica no presenta inclusión de oxígeno, esto ocurre así ya que la pulpa o mucilago que recubre a la almendra no permite el intercambio de gases. El mucilago o pulpa está compuesto por agua, azucares (sacarosa, glucosa y fructosa) y varios ácidos (Cabdy, 2019). Los azucares y un pH ácido fomentan un ecosistema para el crecimiento de los microorganismos. En esta fase destacan hongos y levaduras, bacterias acido lácticas y las propias encimas del mucilago (Erazo, 2019).

Los hongos y levaduras para producir dióxido de carbono, etanol y pequeñas cantidades de energía consumen azucares simples, además, se generan enzimas pectinolíticas para hidrolizar las azucares presentes por la actividad de la invertasa, produciendo y difundiendo ácidos orgánicos (cítrico, acético y láctico) (Zamudio et al., 2021). En esta etapa encontramos la presencia de entre 5 y 6 especies diferentes de lavaduras, que cumplen su ciclo y luego desaparecen, dejando lugar a "*Hanseniaspora guilliermondii"*, durante las primeras 24 horas (M. Wacher, 2021). Cuando la pulpa se descompone, se generan amplios espacios que permiten la entrada de aire. El aumento de pH y el mayor flujo de aire son indicadores de que viene la fase aerobia en la fermentación.

2.6.2. Fase Aeróbica

Esta fase se da en presencia del oxígeno. Para optimizarla, los productores mezclan el cacao en un proceso llamado "rotación" (Abad, 2020), así se asegura la presencia de oxígeno en todos los granos posibles. En esta etapa las protagonistas son las acetobacterias, transformando el etanol y los ácidos (cítrico, málico, láctico) en ácido acético (Cabdy, 2019). Una vez expuestos compuestos como el ácido acético, la presencia de oxígeno lo descompone en compuestos como el dióxido de carbono, es decir, en este proceso aeróbico se libera calor y dióxido de carbono. Las bacterias acéticas más relevantes aisladas de la fermentación de cacao son: *Gluconobacter oxydans*, *Acetobacter aceti* y *Acetobacter pasteurianus* (Wacher, 2021).

Finalmente, con casi ya todos los compuestos iniciales degradados, empieza la degradación de proteínas por bacilos productores de enzimas, catalizadoras de reacciones que producen aromas desagradables, como las proteolíticas las lipolíticas que contribuyen en el sabor, produciendo ácidos orgánicos y saborizantes, como 2,3-butanodiol (Wacher, 2021).

Cuando investigadores utilizaron métodos de detección y caracterización modernos, detectaron bacterias como: *Tatumella, Pantoea* y *Erwinia*, que no se habían reportado nunca antes en la fermentación del cacao (T. García et al., 2020).

2.7. Sustrato para potenciar aroma y sabor en la fermentación

Después de conocer la información requerida en relación a los cambios bioquímicos producidos en la fermentación, surge la necesidad de potenciar este proceso con el fin de mejorar la calidad del cacao (aroma y sabor), para esto hemos considerado el uso de bacterias acéticas y acido lácticas que son las que predominan en las 2 fases de fermentación a través de un sustrato (suero de leche), el cual actúe como vehículo para el uso y difusión de las mismas.

La fermentación puede considerarse como un proceso deseable, guiado por bacterias presentes en un medio, dicha fermentación puede ocurrir de manera espontánea o inducida, si el proceso se realiza de manera espontánea existe la posibilidad que la fermentación no concluya o no se inicie. Por el contrario, si el proceso se induce con cultivos iniciadores seleccionados, la fermentación se realiza en un menor tiempo y de manera controlada (Martínez et al., 2022).

Para inocular el sustrato (suero de leche) utilizamos bacterias acido Lácticas y acido acéticas que son las principales en un proceso de fermentación de cacao.

Tabla 1

Principales microorganismos durante el tiempo de fermentación del cacao

Horas	Bacterias
0	Levaduras
24	Levaduras
48	Levaduras
72	Bacterias Acido Lácticas
96	Bacterias Acido Lácticas
120	Bacterias Acido Acéticas
144	Bacterias Acido Acéticas
168	Bacterias Acido Acéticas

Nota: *Tabla adaptada de* (Ramírez et al., 2011)

2.7.1. *Acetobacter* spp

Las Bacterias acéticas comprenden bacterias Gram-negativos o Gram variables, de forma cilíndrica o elipsoidal, con flagelos, están clasificadas en 19 géneros y 64 especies *Acetobacter* (Silva, 2020) , las principales son:

- *Asaia* (5 especies)
- *Gluconacetobacter* (16 especies)
- *Gluconobacter* (10 especies)

2.7.2. *Lactobacillus* spp

Los *Lactobacillus spp*. son el principal grupo de bacterias acido lácticas y se caracterizan transformar alcoholes en ácido láctico. De morfología bacilos y cocos, no generadores de espora (Rodríguez et al., 2021). De requerimiento nutricional complejo, presente, en frutas, productos fermentados y organismos de seres vivos.

2.7.3. Suero de leche

El suero de leche es un subproducto lácteo generado a partir de la separación de las caseínas. (Contreras, 2024), decidimos utilizarlo por presentar características óptimas para el desarrollo de los microorganismos a usarlo como sustrato.

CAPÍTULO III

3.1. MARCO METODOLÓGICO

3.1.1. Ubicación de la investigación

La presente investigación se realizó en el Laboratorio de Vinculación e Investigación de la Universidad Estatal de Bolívar y en el Complejo Agroindustrial de la Carrera de Agroindustria - Facultad de Ciencias Agropecuarias, Recursos Naturales y del Ambiente.

3.1.1.1. Localización de la Investigación

Tabla 2
Localización de la investigación

Provincia	**Bolívar**
Cantón	Guaranda
Parroquia	Gabriel Ignacio Veintimilla
Sector	Laguacoto II
Dirección	Laguacoto II, (Guaranda Km. 1 ½ vía San Simón)

3.1.1.2. Zona de Vida

La siguiente investigación se realiza en la provincia de Bolívar, cantón Echandía, recinto San Gerardo.

Tabla 3
Zona de vida

Provincia	Bolívar
Cantón	Echandía
Sector	San Gerardo
Dirección	Centro de acopio de cacao y Choco Warmi

3.1.2. Materiales

3.1.2.1. Material experimental

- Mucilago de Cacao Nacional
- Mucilago de Cacao CCN-51
- Suero Láctico
- Cacao CCN-51
- Cacao Nacional
- Cepas de *Acetobacter spp*
- Cepas de *Lactobacillus spp*

3.1.2.2. Materiales de laboratorio

- Cofia
- Guantes
- Mascarillas
- Mandil
- Gel antimaterial
- Alcohol
- Placas Petri
- Matraces Erlenmeyer
- Asa de siembra
- Papel film
- Agitador
- Papel aluminio
- Probetas
- Termómetro
- Espátulas
- Gradillas
- Mecheros de alcohol
- Porta y cubre objetos
- Pinzas
- Crisoles
- Papel aluminio
- Pipetas Pasteur
- Vasos de precipitación
- Capsulas
- Crisoles
- Kit de titulación
- Tiras pH
- Pipetas
- Refractómetro

3.1.2.3. Reactivos

- Agar MRS TM146
- Caldo MRS
- *Acetobacter* ágar (Extracto de levadura, agar, glucosa, carbonato de cálcio).
- Rojo de metileno
- Alcohol 96%
- Agua destilada
- Lugol
- Safranina
- Peróxido de hidrógeno 3%
- Glicerol; Código 597
- Hidróxido de sodio 0.1N
- Aceite de inmersión

3.1.2.4.Equipos

Tabla 4

Equipos

Equipo	Marca
Estufa	MEMMERT
Balanza analítica	RADWAG
Balanza gravimétrica	Core Balance
Cámara de flujo laminar	Biobase
Microscopio	Nikon eclipse
Potenciómetro	Hanna Intruments
Autoclave	Tridont
Congelador	Biobase
Cuenta colonias	Scan 300
Mufla	Hobersal
Microcentrífuga	Eppendorf
Balanza Digital	Shimadzu
Determinador de Grasa	Raypa
Refrigerador	Indurama
Refractómetro	Accud Co. Ltd
Centrifuga	Hamilton medical VanGuard V6500.
Bomba de vacío	Edwards E2M28.

Nota: Los equipos están distribuidos entre el laboratorio de investigación de la UEB, la planta de procesos de la Facultad de Ciencias Agronómicas de la UEB y los portátiles usados en campo.

3.1.3. Metodología

Para el desarrollo de investigación, cumpliendo los objetivos, se realizaron 3 diseños experimentales descritos a continuación.

3.1.3.1. Factores de estudio

3.1.3.1.1. Modelo 1 Aplicado para el sustrato con *Acetobacter spp*

Se realizó un estudio a partir de un diseño experimental AxB en el cual existen 2 factores de estudio (Concentración de sustrato y Tiempo) cada uno con tres niveles; con sus variables respuesta (pH, grados Brix y Conteo de colonias).

Tabla 5

Tabla de factores modelo 1

Factores	Código	Nivel
Concentración de Sustrato (Suero + *Acetobacte*r)	A	a_1: 5% + 0,1% a_2: 10% + 0,5% a_3: 15 % + 1 %
Tiempo	B	b_1: 24 horas b_2: 48 horas b_3: 72 horas

3.1.3.1.2. Modelo 2 Aplicado para el sustrato con Lactobacillus spp

Se realiza un estudio a partir de un diseño experimental AxB en el cual existen dos factores de estudio (Concentración de sustrato y Tiempo) cada uno con tres niveles; con sus variables respuesta (pH, grados Brix y Conteo de colonias).

Tabla 6

Tabla de factores modelo 2

Factores	Código	Nivel
Concentración de sustrato Suero + *Lactobacillus*	A	a_1: 5% + 0,1% a_2: 10% + 0,5% a_3: 15 % + 1 %
Tiempo	B	b_1: 24 horas b_2: 48 horas b_3: 72 horas

3.1.3.1.3. Modelo 3 Aplicado para la fermentación

Se realizo un experimental para la fermentación aplicando los diferentes sustratos. Se realizó un estudio a partir de un diseño experimental AxBxC en el cual existen tres factores de estudio (Variedad de cacao, Tipo de sustrato y Tiempo) con sus respectivos niveles; y sus variables respuesta (pH, grados Brix, color de corte en la almendra (Morado malo (0); Regular (1); bueno (2)).

Tabla 7

Tabla de factores modelo 3

Factores	Código	Nivel
Variedad de Cacao	A	a_1: Nacional
		a_2: CCN-51
Tipo de Sustrato	B	b_1: S+L
		b_2: S+A
		b_3: S+L+A
Tiempo	C	c_1: 24 horas
		c_2: 48 horas
		c_3: 72 horas

Nota: En el área de los niveles del factor B, la letra L representa la palabra *Lactobacillus spp*, la letra S representa la palabra suero y la letra A representa la palabra *Acetobacter spp*.

3.1.3.2.Tratamientos

Los tratamientos son las combinaciones entre todos los factores declarados para el análisis con su respectivo nivel.

Tabla 8

Tabla de tratamientos modelo 1

Tratamiento	Código	Descripción	
T1	a1b1	5% + 0,1%	24
T2	a1b2	5% + 0,1%	48
T3	a1b3	5% + 0,1%	72
T4	a2b1	10% + 0,5%	24
T5	a2b2	10% + 0,5%	48
T6	a2b3	10% + 0,5%	72
T7	a3b1	15% + 1%	24
T8	a3b2	15% + 1%	48
T9	a3b3	15% + 1%	72

Tabla 9

Tabla de tratamientos modelo 2

Tratamiento	Código	Descripción	
T1	a1b1	5% + 0,1%	24
T2	a1b2	5% + 0,1%	48
T3	a1b3	5% + 0,1%	72
T4	a2b1	10% + 0,5%	24
T5	a2b2	10% + 0,5%	48
T6	a2b3	10% + 0,5%	72
T7	a3b1	15% + 1%	24
T8	a3b2	15% + 1%	48
T9	a3b3	15% + 1%	72

Tabla 10

Tabla de tratamientos modelo 3

Tratamiento	Código	Descripción		
T1	a1b1c1	Nacional	S+*L*	24
T2	a1b1c2	Nacional	S+*L*	48
T3	a1b1c3	Nacional	S+*L*	72
T4	a1b2c1	Nacional	S+*A*	24
T5	a1b2c2	Nacional	S+*A*	48
T6	a1b2c3	Nacional	S+*A*	72
T7	a1b3c1	Nacional	S+*L*+*A*	24
T8	a1b3c2	Nacional	S+*L*+*A*	48
T9	a1b3c3	Nacional	S+*L*+*A*	72
T10	a2b1c1	CCN-51	S+*L*	24
T11	a2b1c2	CCN-51	S+*L*	48
T12	a2b1c3	CCN-51	S+*L*	72
T13	a2b2c1	CCN-51	S+*A*	24
T14	a2b2c2	CCN-51	S+*A*	48
T15	a2b2c3	CCN-51	S+*A*	72
T16	a2b3c1	CCN-51	S+*L*+*A*	24
T17	a2b3c2	CCN-51	S+*L*+*A*	48
T18	a2b3c3	CCN-51	S+*L*+*A*	72

Nota: En el área de los niveles del factor B, la letra *L* representa la palabra *Lactobacillus spp*, la letra S representa la palabra suero y la letra *A* representa la palabra *Acetobacter spp*.

3.1.3.3.Descripción de las unidades experimentales

3.1.3.3.1. Descripción de la unidad experimental modelo 1

El diseño está colocado de tal forma que, mediante 2 factores, cada uno con 3 niveles se encuentren 3 variables respuestas en donde por cuantificación se dirigirá hacia el mejor tratamiento.

Tabla 11

Tabla de características del diseño experimental modelo 1

Características del diseño			Niveles
Número de factores experimentales	2	Concentración de sustrato Suero + *Acetobacter spp*	3
		Tiempo	3
Número de respuestas	3	pH grados Brix Conteo de Colonias	
Número de corridas	18		
Grados de libertad para el error	9		
Réplica	2		
Tamaño de la unidad experimental	50	Litros de suero	
	3	Gramos de Bacteria	

3.1.3.3.2. Descripción de la unidad experimental modelo 2

El diseño está colocado de tal forma que, mediante 2 factores, cada uno con 3 niveles, sirvan para encontrar 3 variables respuestas en donde por análisis inferencial se dirigirá hacia el mejor tratamiento.

Tabla 12

Tabla de características del diseño experimental modelo 2

Características del diseño			Niveles
Número de factores experimentales	2	Concentración de sustrato	3
		Suero + *Lactobacillus spp*	
		Tiempo	3
Número de respuestas	3	pH	
		Grados Brix	
		Conteo de Colonias	
Número de corridas	18		
Grados de libertad para el error	9		
Réplica	2		
Tamaño de la unidad experimental	50	Litros de suero	
	3	Gramos de Bacteria	

3.1.3.3.3. Descripción de la unidad experimental modelo 3

El diseño está colocado de tal forma que, mediante 3 factores, cada uno con sus niveles y se encuentren 3 variables respuestas en donde por cuantificación se dirigirá hacia el mejor tratamiento.

Tabla 13

Tabla de características del diseño experimental modelo 3

Características del diseño			Niveles
Número de factores experimentales	3	Variedad de Cacao	2
		Tipo de sustrato	3
		Tiempo	3
Número de respuestas	3	pH	
		Grados Brix	
		Color del corte de la almendra	
Número de corridas	48		
Grados de libertad para el error	40		
Réplica	2		
Tamaño de la unidad experimental	50	Litros de suero	
	3	Gramos de Bacteria	

3.1.3.4.Tipos de diseño experimental

3.1.3.4.1. Modelo 1 y 2 (Diseño experimental AXB)

Se aplica un diseño experimental en arreglo factorial AxB con 2 repeticiones, el modelo matemático es el siguiente:

$$\boldsymbol{Y_{ijk} = \mu + \alpha_i + \beta_j + (\alpha\beta)_{ij} + \varepsilon_{ijk}} \qquad (1)$$

Donde*:*

$\boldsymbol{\mu}$: Media general.

$\boldsymbol{\alpha_i}$: Efecto del nivel i-ésimo nivel del factor A.

$\boldsymbol{\beta_j}$: Efecto del j-esimo nivel del factor B.

$(\boldsymbol{\alpha\beta})_{ij}$ Efecto de interacción entre ambos factores.

$\boldsymbol{\varepsilon_{ijk}}$: Error aleatorio en la combinación *ijk*.

3.1.3.4.2. Modelo de Análisis de varianza (ANOVA) para el diseño AxB

Tabla 14

Modelo de análisis de varianza (ANOVA) para el diseño en arreglo factorial AxB

Fuente de variabilidad	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado medio	F_0	Valor-p
Efecto A	SC_A	a-1	SC(A)/GL(A)	CM_A/CM_E	$P(F>F_0^A)$
Efecto B	SC_B	b-1	SC(B)/GL(B)	CM_B/CM_E	$P(F>F_0^B)$
Interacción AxB	SC_{AxB}	(a-1) (b-1)	SC(AB)/GL(AB)	CM_{AB}/CM_E	$P(F>F_0^{AB})$
Error	SC_{Error}	ab (n - 1)	SC(Error)/GL(Error)		
Total	SC_{Total}	abn-1			

Nota: tomado de *Análisis y diseño de experimentos, por* (Gutiérrez & De la Vara, 2012).

3.1.3.4.3. Modelo de la prueba de Rangos Múltiples del diseño AXB

Se aplicará el método de la diferencia mínima significativa (LSD) para probar la igualdad de todos los posibles pares de medias:

$$\boldsymbol{LSD = \left|\overline{Y}_i - \overline{Y}_j\right| > t_{\left(\frac{\alpha}{2}, N-k\right)}\sqrt{CM_E\left(\frac{1}{n_i}+\frac{1}{n_j}\right)}} \qquad (2)$$

Donde:

$\boldsymbol{LSD}$**:** diferencia mínima significativa.

$\boldsymbol{k}$**:** número de tratamientos.

$\left|\overline{Y}_i - \overline{Y}_j\right|$**:** valor absoluto entre las medias muestrales.

$t_{\left(\frac{\alpha}{2}, N-k\right)}$**:** distribución T de student con N-*k* grados de libertar que corresponde al error.

CM_E**:** cuadrado medio del error que se obtiene de la tabla ANOVA.

n_i, n_j **:** Numero de observaciones para los tratamientos i, j, respectivamente.

3.1.3.4.4. Modelo 3 (Diseño experimental AXBXC)

Se aplicó un diseño experimental en arreglo factorial AxBxC con 2 repeticiones, el modelo matemático es el siguiente:

$$Y_{ijkl} = \mu + \alpha_i + \beta_j + \gamma_k + (\alpha\beta)_{ij} + (\alpha\gamma)_{ik} + (\beta\gamma)_{jk} + (\alpha\beta\gamma)_{ijk} + \varepsilon_{ijkl} \quad (3)$$

Donde:

μ: Media general.

α_i: Efecto debido al i-esimo nivel del factor a.

β_j: Efecto del j-esimo nivel del factor b.

γ_k: Efecto del j-esimo nivel del factor c.

$(\alpha\beta)_{ij}, (\alpha\gamma)_{ik}, (\beta\gamma)_{jk}$: Efecto de interacción doble en los niveles ij, ik, jk.

$(\alpha\beta\gamma)_{ijk}$: Efecto de interacción triple en la combinación ijk.

ε_{ijkl}: Error aleatorio en la combinación ijk.

3.1.3.4.5. Modelo de Análisis de varianza (ANOVA) para el diseño AxBxC

Tabla 15

Modelo de análisis de varianza (ANOVA) para el diseño en arreglo factorial AxBxC

Fuente de variabilidad	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado medio	F_0	Valor-p
Efecto A	SC_A	a-1	CM_A	CM_A/CM_E	$P(F > F_0^A)$
Efecto B	SC_B	b-1	CM_B	CM_B/CM_E	$P(F > F_0^B)$
Efecto C	SC_C	c-1	CM_C	CM_C/CM_E	$P(F > F_0^C)$
Efecto AB	SC_{AB}	(a-1)(b-1)	CM_{AB}	CM_{AB}/CM_E	$P(F > F_0^{AB})$
Efecto AC	SC_{AC}	(a-1)(c-1)	CM_{AC}	CM_{AC}/CM_E	$P(F > F_0^{AC})$
Efecto BC	SC_{BC}	(b-1)(c-1)	CM_{BC}	CM_{BC}/CM_E	$P(F > F_0^{BC})$
Efecto ABC	SCA_{BC}	(a-1)(b-1)(c-1)	CMA_{BC}	CMA_{BC}/CM_E	$P(F > F_0^{ABC})$
Error	SC_E	abc(n -1)	CM_E		
Total	SC_T	abcn-1			

Nota: tomado de *Análisis y diseño de experimentos, por* (Gutiérrez & De la Vara, 2012)

3.1.3.4.6. Modelo de la prueba de Rangos Múltiples

Se aplicará el método de la diferencia mínima significativa (LSD) para probar la igualdad de todos los posibles pares de medias:

$$\boldsymbol{LSD = \left|\overline{Y}_i - \overline{Y}_j\right| > t_{\left(\frac{\alpha}{2}, N-k\right)}\sqrt{CM_E\left(\frac{1}{n_i}+\frac{1}{n_j}\right)}} \qquad (4)$$

Donde:

$\boldsymbol{LSD}$**:** diferencia mínima significativa.

$\boldsymbol{k}$**:** número de tratamientos.

$\boldsymbol{\left|\overline{Y}_i - \overline{Y}_j\right|}$**:** valor absoluto entre las medias muestrales.

$\boldsymbol{t_{\left(\frac{\alpha}{2}, N-k\right)}}$**:** distribución T de student con N-*k* grados de libertar que corresponde al error.

$\boldsymbol{CM_E}$**:** cuadrado medio del error que se obtiene de la tabla ANOVA.

$\boldsymbol{n_i, n_j}$ **:** Numero de observaciones para los tratamientos i, j, respectivamente.

3.1.4. Manejo del experimento

3.1.4.1. Selección, cosecha y post cosecha del cacao

Al proceso de selección, cosecha y postcosecha de cacao se le conoce como "Beneficio del cacao". Cundo el fruto de cacao llega a su punto de maduración (en Nacional los frutos verdes se tornan amarillos y en CCN-51 frutos rojo vino se tornan rojo intenso o naranja), procedemos con la cosecha, cortando el fruto sin afectar la planta (Compañía Nacional de Chocolates S.A.S., 2019).

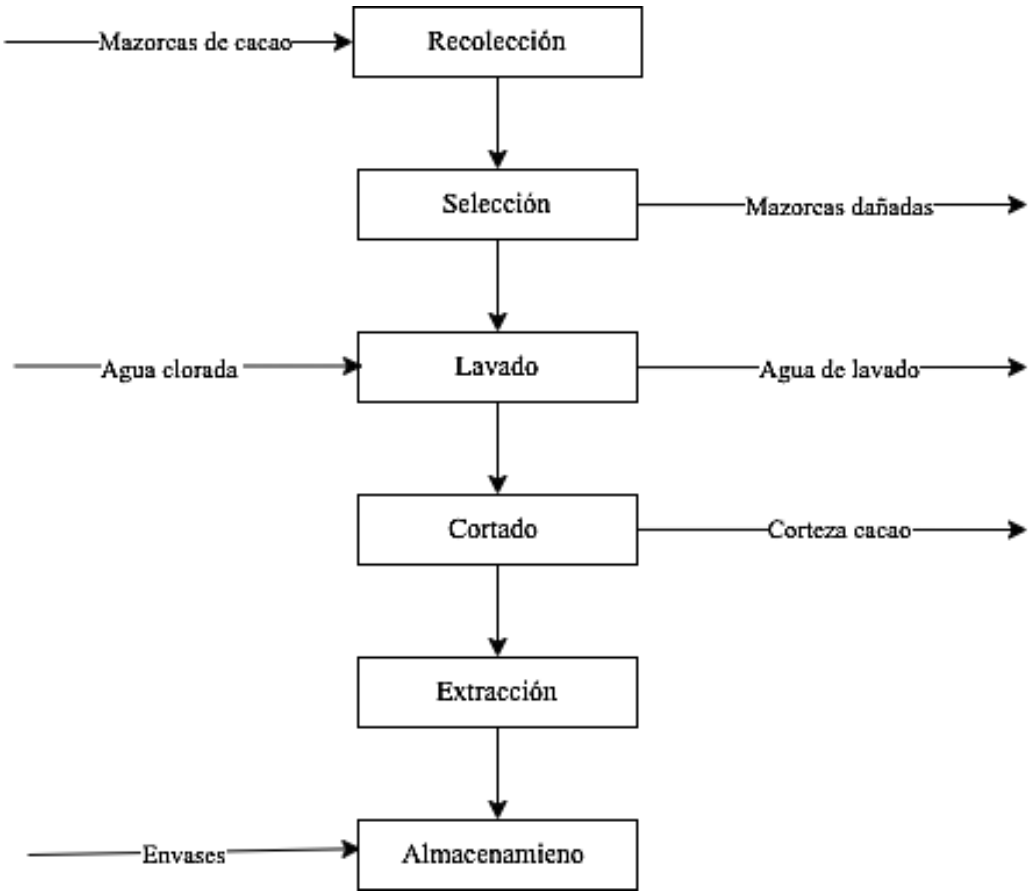
A continuación, describiremos el proceso.

- **Recolección:** Los frutos de cacao se recolectaron de algunas fincas ubicadas en el recinto San Gerardo, cantón Echeandía (tanto Nacional y CCN-51).
- **Selección:** Se seleccionaron frutos de cacao adecuados hasta llegar a la cantidad requerida.
- **Lavado:** Las mazorcas recolectadas fueron lavadas con una solución de dióxido de cloro (3000 ppm) y agua (aproximadamente 15 mL de dióxido de cloro por litro de agua) y luego enjuagadas en agua potable.
- **Cortado:** Se realizo un corte transversal entre la planta y el fruto, envidando dañar tanto la planta como el fruto.

- **Extracción:** Se procedió al desgrane de la mazorca de cacao utilizando recipientes limpios y guantes para así evitar la contaminación cruzada.
- **Almacenamiento:** Se los depositó en envases plásticos, limpios y con tapa y se los puso en congelación para así evitar su degradación.

Figura 1

Diagrama de Beneficio de cacao



3.1.4.2.Caracterización de la materia prima (físico químico)

3.1.4.2.1. Acidez titulable

Es una aproximación de la acidez total, la cual mide los iones de hidrógeno asociados y disociados (Lallemand Brewing, 2024).

3.1.4.2.1.1. Determinación de acidez de mucilago de cacao

En conformidad con la norma INEN-ISO750:2013 Productos vegetales y de frutas-determinación de la acidez titulable: Para la se utiliza un indicador de color (INEN, 2013).

Según norma INEN 13, determinación de acidez se realizó por titulación, con una solución de hidróxido de sodio valorada 0.1 N, se diluyo la muestra en un matraz Erlenmeyer de 250 mL, se añade una alícuota de 50 mL de agua y 5 mL de muestra, se agito constantemente y se añadió de forma cuidadosa fenolftaleína hasta conseguir la coloración rosa persistente.

El resultado se presentó como porcentaje de ácido cítrico (0,064) con aproximación a milésimas (Jordan, 2020).

Se valoro mediante la siguiente ecuación:

$$\%\boldsymbol{Acidez} = \mathbf{0,064}\ \frac{\boldsymbol{V}\ \times \boldsymbol{N}}{\boldsymbol{m1} - \boldsymbol{m}} \times \mathbf{100} \quad (\mathbf{5})$$

Donde:

%Acidez: Acidez titulable del Mucilago de Cacao.

0,064 milésimas: miliequivalente Ácido Cítrico

***V*:** Volumen de la Solución de Hidróxido de Sodio empleado en la titulación en cm^3

N: Normalidad de la solución de Hidróxido de sodio.

m1: Matraz con la muestra (g)

***m*:** Matraz vacío (g)

3.1.4.2.1.2. Para la determinación de Acidez de Almendras de Cacao

La referencia fue el método AOAC (2016) 942.15, "Titulación potenciométrica".

Se peso 5 g de almendras en un vaso de precipitación. Se agregó 50 mL de agua caliente a las almendras y se enfrió, esta mezcla se filtró en papel filtro.

Se título el sobrenadante con hidróxido de sodio 0,1N hasta llegar a un pH 8,2. Finalmente se contabilizó el volumen desgastado (Loo, 2019).

Para calcular la acidez mediante el volumen gastado, se aplicó la siguiente ecuación.

$$\%\boldsymbol{Acidez} = \frac{\boldsymbol{V_g} \times \boldsymbol{N} \times \boldsymbol{F.D} \times \boldsymbol{F.E}}{\boldsymbol{m}} \times \mathbf{100}\% \quad (\mathbf{6})$$

Donde:

***V_g*:** Volumen de gasto de hidróxido de sodio (ml)

N: Normalidad de la solución (eq/L)

F.D: Factor de disolución de la muestra.

F.E: miliequivalente ácido acético

m: peso de la muestra en g

3.1.4.2.1.3. Para la determinación de acidez de Suero de Leche

Se maneja la misma norma INEN 13, determinación de acidez por titulación con una dilución de hidróxido de sodio 0.1N. Se realizo el mismo procedimiento usado para el cálculo de acidez de las almendras.

3.1.4.2.2. Potencial de hidrogeno (pH)

Para poder entender el concepto de pH (potencial de hidrógeno) es necesario conocer el un ácido. En 1923 los investigadores Thomas Martin Lowry y Johannes Nicolaus Brønsted establecieron un postulado de bases y ácidos (*Teoría ácido-base de Brönsted-Lowry***)**, aquí se menciona que los ácidos donan un protón (H+) y las bases los aceptan. Podernos interpretarlo como reacción de transferencia de protones (D. García, 2019). Con este antecedente se creó una escala que va de 0 (ácido) a 14 (alcalino) siendo el 7 el punto neutro. El pH se mide a través de un potenciómetro, a continuación, describiremos el procedimiento.

- En un vaso de pesó 10 g de cada una de las muestras.
- Se midió 90 g de agua destilada
- Reposó 10 min
- Se midió por medio de un potenciómetro y se toma datos de 3 replicas
- Se saca un promedio y se compara con la normativa.

El mucílago con pH entre 3,0 y 3,5 es ácido por su contenido de ácido cítrico (Penha & Matta 1998). Para pH de la almendra los valores fluctuaron entre 5,19 – 5,26 (Rivera, 2018). El cacao con un pH entre 5,143 – 4,575 se considera correctamente considerable para la fermentación. Para el suero de leche el pH según la INEN 2594:2011 es de un rango 6,8 - 6,4.

3.1.4.3.Caracterización de la materia prima (proximal)

3.1.4.3.1. Grasa

La determinación de grasas se la realizo mediante extracción a partir de solventes orgánicos, por el método Soxhlet. El solvente, se calentó, volatilizó y condensó mediante goteo sobre la muestra sumergida. Luego se lo condujo al matraz de calentamiento. Se lo cuantifico por diferencia de peso (Marquez, 2014). A continuación, detallaremos el procedimiento.

- **Mucílago de cacao:** Se extrajo de la almendra de cacao

- **Almendra de cacao:** Se molió la almendra en un tamaño adecuado para el análisis.
- **Suero de leche:** La muestra generalmente se encuentra en estado líquido y no requiere preparación especial.
- De cada una de las muestras se pesó un gramo en la balanza analítica y se anota el peso con 4 decimales, se coloca cada muestra en el dedal tapando con algodón.
- En este procedimiento se realizó solo con dos replicas.
- Antes de empezar el procedimiento se preparó los crisoles, se los taró durante 40 min en la estufa, enfriarlos en el desecador por 40 min.
- Se llevó los crisoles al extractor de gases y se coloca en cada uno de ellos 50 mL de Hexano.
- Cada uno de los dedales se los llevó al determinador de grasa y se los conecta con los imanes se levanta las correas y se coloca los crisoles con el hexano.
- Se abrió las llaves y bajó las correas a 80°C durante 40 min, pasado ese tiempo se subió las correas y se deja reposar por 20 min.
- Por último, se cerró las llaves y se esperó 40 min.
- Se sacó y pesó los crisoles, obteniendo la grasa de las muestras.
- Se sumó el peso del crisol con el peso de la muestra.
- Luego se restó esta suma con el peso final de crisol después de pasar por el determinador de grasa.
- Este resultado se restó con el peso de la muestra y se obtuvo la cantidad de grasa de las muestras en gramos.

3.1.4.3.2. Proteína

Se lo realizo por método de Dumas que consiste en incinerar a temperaturas comprendidas entre 700 y 1000 °C infundiendo oxigeno puro para transformar el carbono presente en dióxido de carbono. Las sustancias que tienen nitrógeno lo liberan en forma de N_2y NO_2, que son reducidas en una columna 600°C. A continuación, detallaremos el proceso.

- Se combustiona las muestras añadiendo oxigeno puro a 1000°C.
- Los gases obtenidos se incorporan al sistema con un gas portador,

normalmente helio. EL hidróxido de helio presente se transforma en nitrógeno puro en una superficie de cobre.

- El dióxido de carbono y el agua se separan mediante trampas específicas.
- Durante todo el proceso fluye el gas y es medido por un medidor de conductividad térmica (TCD).
- Con el TCD se mide la cantidad de nitrógeno generado y se calcula la grasa por diferencia de pesos.

La ecuación para calcular el contenido de proteínas es:

$$\textbf{Contenido de proteína}(\%) = \frac{\textbf{Nitrógeno medido}}{\textbf{Factor de conversión}} \times \mathbf{100} \qquad (\mathbf{8})$$

Es importante destacar que el método de Dumas es muy preciso y se utiliza comúnmente en laboratorios para la determinación de proteínas en alimentos y muestras biológicas. Además, este método es rápido y no requiere el uso de reactivos peligrosos en grandes cantidades.

3.1.4.3.3. Humedad

Se la realza por el "método gravimétrico indirecto, por desecación para el análisis de la humedad de unión de alimento", consiste en la medición de peso constante que va teniendo por perdida de humedad (Garcia & Fernández, 2019). A continuación, describiremos el procedimiento.

- Se pesó 3 g de cada una de las muestras
- Se colocó las capsulas vacías en la estufa a 130°C por 1 hora.
- Posterior a ese tiempo se sacó las capsulas y dejó enfriar en el desecador por 50 min.
- Ya frías las capsulas se pesó y anotó su peso con tres gramos de muestra.
- Se colocó en la estufa durante 1 hora a 130°C.
- Se retiró de la estufa, se enfrió en el desecador por 50 min y se tomó su peso final.

3.1.4.3.4. Cenizas

Se refiere al contenido de elementos no orgánicos que se generan después de incinerar la muestra. (Flores et al., 2021). A continuación, describiremos el proceso.

- Se pesó 1 g de cada una de las muestras.
- Se taró los crisoles a 130°C por una hora en la estufa posterior a esto se

colocó en el desecador y se deja enfriar durante 50 min.

- Una vez frío, se pesó 1g de muestra.
- Se calentó la mufla a 250°C.
- Una vez enfriados los crisoles se los pesó y colocó 1g de muestra.
- Se colocó en la mufla a la temperatura correspondiente y se deja durante 1 hora.
- Pasado este tiempo sin sacar los crisoles se aumentó la temperatura a 500°C por dos horas.
- Se sacó los crisoles y se enfrió en un desecador por 50 min y luego pesar.

3.1.4.3.5. Material volátil

En el análisis proximal de los alimentos, el material volátil generalmente se refiere a los componentes que pueden evaporarse o volatilizarse cuando se someten a ciertas condiciones de calor. Para la almendra de cacao, el mucílago de cacao y el suero láctico, estos materiales volátiles pueden incluir varios compuestos orgánicos como alcoholes, ácidos orgánicos, ésteres, aldehídos, cetonas y otros compuestos aromáticos y volátiles. A continuación, describiremos el procedimiento.

- Se colocó los crisoles en la estufa a 105ºC durante una hora.
- Se pesó los crisoles con tapa.
- Se colocó 1g de la muestra en cada crisol durante 24 horas.
- Se pesó y anotó los pesos.

3.1.4.4.Preparación del sustrato

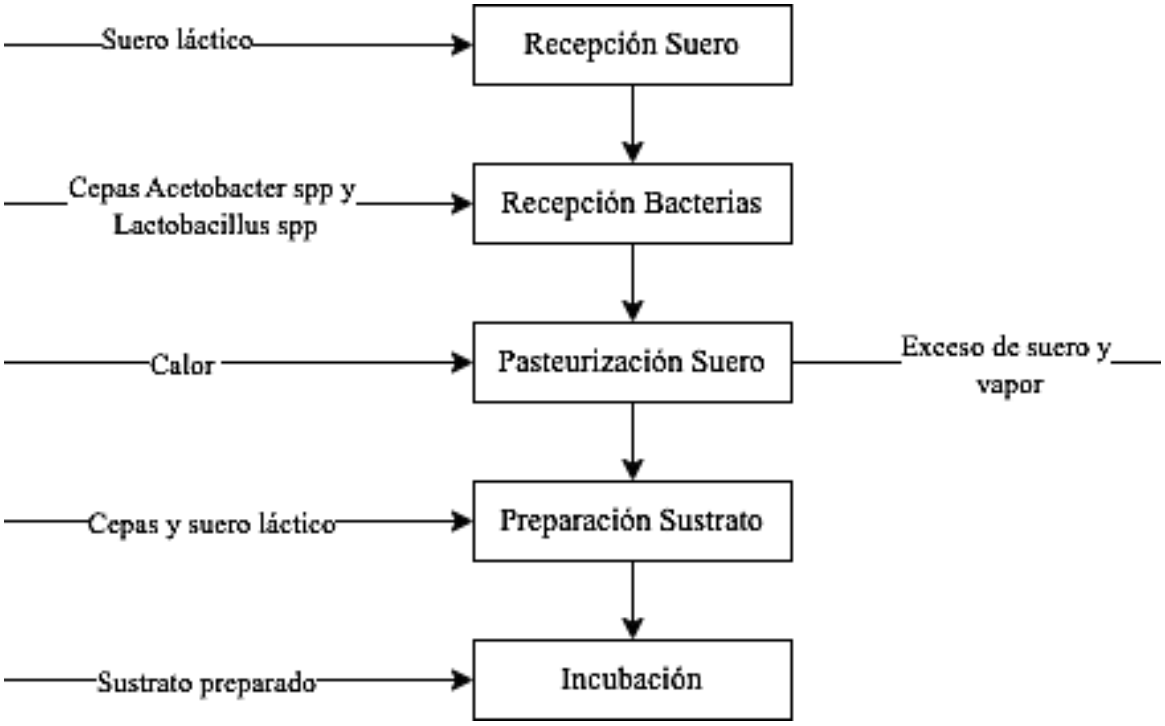
Una mezcla de sustancias que permite generar un ecosistema de microorganismos (Agroequipos de Valle, 2018). Para poder replicar material que contenga los microorganismos deseados debemos preparar un sustrato a base se suero láctico. A continuación, describiremos el proceso.

- **Recepción suero láctico:** Se receptó suero láctico posterior a su verificación.
- **Recepción bacterias:** Se receptaron las bacterias (*Acetobacter spp* y *Lactobacillus spp*) y se verificó que su buen estado.
- **Pasteurización suero**: El suero se pasteurizó a una temperatura de 65°C por un periodo de 20 min.

- **Preparación de sustrato:** Se colocaron 3g de cada sobre en 50 L de suero y debe ser controlado con el tiempo y la temperatura.
- **Incubación:** Se incubó el sustrato en una estufa a 35 ºC.

Figura 2

Diagrama de preparación de sustrato



3.1.4.5. Caracterización de los inóculos (Suero+ *Acetobacter spp* y Suero + *Lactobacillus spp*)

3.1.4.5.1. Tinción de Gram

Hans Christian Gram, desarrolló una técnica para diferenciar bacterias en Gram positivas y Gram negativas (Jiménez, 2022). A continuación, describiremos el proceso.

- **Preparación de la muestra:** Se tomó una porción de muestra del microorganismo y se colocó sobre un portaobjetos limpio con una gota de agua.
- **Fijación:** Se seca la muestra para fijar en el `portaobjetos.
- **Tinción inicial:** Se aplicó siete gotas de violeta de genciana sobre la muestra y se dejó actuar durante 1 minuto.

- **Mordiente:** Sin lavar se colocó y se mezcló siete gotas de Lugol sobre la muestra durante 1 minuto.
- **Enjuague:** Se enjuago la muestra con 10 mL de agua destilada para retirar el exceso.
- **Decoloración:** Se aplicó diez gotas alcohol 96% sobre la muestra durante 30 segundos.
- **Enjuague**: Se enjuago la muestra con 10 mL de agua destilada para retirar el exceso de alcohol.
- **Contra tinción:** Se aplicó diez gotas de safranina sobre la muestra y durante 3 min.
- **Enjuagar:** Se enjuago la muestra con 10 mL de agua destilada para retirar el exceso de safranina.
- **Secado:** La muestra se dejó secar y se colocó una gota de aceite de inmersión.
- **Observación:** Se visualizó la muestra al microscopio para sy determinación (Gram positiva azul o Gram negativa rosa).

3.1.4.5.2. Prueba de catalasa

La catalasa es una proteína (enzima) para la descomposición del peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno. La mayoría de bacterias sintetizan catalasa (Corrales et al., 2022). A continuación, describiremos el proceso.

- Se colocó una porción de la bacteria en un portaobjetos.
- Se agregó dos gotas de peróxido de hidrógeno al 3% concentrado al portaobjetos con la bacteria.
- Se observó si presenta efervescencia (positiva), lo que indica que la enzima catalasa de la bacteria ha descompuesto el peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno, de lo contrario (negativa).

3.1.4.5.3. Conteo de bacterias del sustrato (UFC/ml)

Esta técnica de evaluación se utilizó con el fin de determinar si los procedimientos relacionados con los medios para la multiplicación de microorganismos fueron los más adecuados. Para la cinética de crecimiento fue necesario utilizar la siguiente ecuación que permite encontrar las unidades formadoras de colonias sobre ml de líquido.

$$n = \frac{Log\ (Nn/No)}{Log\ 2} \qquad (9)$$

$$n = \frac{t}{g}$$

$$g = \frac{t}{n}$$

Donde:

$\boldsymbol{Nn}$: Número final de microrganismos

$\boldsymbol{No}$: Número inicial de microrganismos

$\boldsymbol{g}$: Número generacional

$\boldsymbol{n}$: Número de generación

$\boldsymbol{t}$: temperatura de incubación

A continuación, describiremos el procedimiento.

- Se realizó diluciones (1/10), (1/100), (1/1000) del cultivo en caldo MRS y solución salina al 0,5%.
- Se preparo medio MRS.
- Se sembró en placas Petri las muestras en cada una de las diluciones, respectivamente.
- Se incubó en una estufa a 30ºC por 72 horas y se contó las colonias cada 12 horas.

3.1.4.6.Fermentación de cacao Nacional y CCN-51 en laboratorio

Para realizar el experimento es necesario tomar en cuenta los factores y variables respuesta del diseño experimental modelo 3 (**Tabla 13**).

Para determinar las concentraciones a usar en la fermentación de acuerdo al diseño experimental modelo 3 se estableció como unidad experimental 50L de suero y 3g de bacterias (*Acetobacter spp* y *Lactobacillus spp* respectivamente), se lo realizó así ya que un sobre de *Lactobacillus* de una casa comercial "Danisco", contiene 3g de bacteria liofilizada y sirve para incubar 50L de fluido a usarse (suero), en este caso suero láctico. A continuación, describiremos la distribución de las combinaciones utilizadas de bacterias y suero.

Tabla 16

Combinaciones de sustratos aplicados al experimento de fermentación

Tipo de cacao	Combinación sustrato	Concentración suero	Concentración bacteria (%)	Cantidad suero (mL)	Cantidad bacteria (mg)
CACAO NACIONAL	S+*L*	5	0.1	5	0,3
	S+*L*	10	0.5	10	0,6
	S +*L*	15	1	15	0,9
CACAO CCN-51	S+*L*	5	0.1	5	0,3
	S+*L*	10	0.5	10	0,6
	S +*L*	15	1	15	0,9
CACAO NACIONAL	S+*A*	5	0.1	5	0,3
	S+*A*	10	0.5	10	0,6
	S+*A*	15	1	15	0,9
CACAO CCN-51	S+*A*	5	0.1	5	0,3
	S+*A*	10	0.5	10	0,6
	S+*A*	15	1	15	0,9

Nota: La sigla S corresponde a la palabra sustrato, la sigla *L* corresponde a la cepa de *Lactobacillus spp* y la sigla *A* corresponde a la cepa de *Acetobacter spp*.

Según (Ramírez et al., 2021), el tiempo de fermentación se desarrolla en etapas de crecimiento de los tres grupos de microorganismos.

- Las mohos y levaduras crecen desde la hora 0 hasta las 48 horas.
- Las BAL (*Lactobacillus spp*) crecen a partir de la hora 48 hasta la hora 96.
- Las BAA (*Acetobacter spp*) crecen a partir de la hora 90 hasta la hora 168.

De acuerdo a lo mencionado describiremos el procedimiento.

Se colocó 100g de cacao Nacional y CCN-51 en matraces de 250 mL posterior a esto se midió pH y grados Brix.

- Se colocó los matraces en una estufa a 30ºC, boca abajo, sellados con Petri film, perforados y con un vaso de precipitación en la punta del matraz para drenar la baba de las muestras.
- A las 48 horas se añadió el sustrato (Suero + *Lactobacillus spp*) a las muestras que correspondían, se devolvió las muestras a la incubadora.
- A las 90 horas se añadió el sustrato (Suero + *Acetobacter spp*) a las muestras que correspondía y se continuo con el proceso.

- Durante todo el proceso se fue drenando y moviendo las muestras, además se tomó datos de pH, grados Brix y temperatura cada 24 horas para monitorear el proceso.
- Terminado el proceso de fermentación a las 168 horas se procedió a sacar el cacao de los matraces y colocarlos en bandejas de aluminio, midiendo por última vez pH, grados brix y temperatura.
- Se realizó la prueba de corte de almendra para verificar la calidad de la fermentación (1 por muestra).
- Por prueba sensorial se verifico el aroma de las muestras, encontramos los resultados deseados.
- Se secó las muestras de cacao en un secador por convección de aire a 45 ºC durante 48 horas hasta llegar al porcentaje de humedad que exige la norma.

3.1.4.7. Fermentación de los mejores resultados en el recinto San Gerardo

Una vez obtenidos resultados deseados en muestras a escala laboratorio, trasladamos el experimento (los mejores resultados) al lugar de procedencia del cacao (Recinto San Gerardo, cantón Echeandía), para lo cual decidimos escalar el proceso de fermentación, manteniendo las proporciones de la muestra experimental de la fermentación a escala laboratorio (3g de bacteria / 50L de suero láctico) pero, agrandando el volumen de la muestra de cacao (5kg por muestra).

Tabla 17

Diseño muestral de la fermentación de cacao en el recinto San Gerardo

Muestras		Concentración de sustrato	Cantidad del sustrato	Cantidad de la muestra de cacao
NACIONAL	M1	Sin sustrato	Sin sustrato	5000 g
	M1R1	Sin sustrato	Sin sustrato	5000 g
CCN51	M2	Sin sustrato	Sin sustrato	5000 g
	M2R1	Sin sustrato	Sin sustrato	5000 g
NACIONAL	M3	10%+0,5%	500ml+0,03g	5000 g
	M3R1	10%+0,5%	500ml+0,03g	5000 g
CCN51	M4	10%+0,5%	500ml+0,03g	5000 g
	M4R1	10%+0,5%	500ml+0,03g	5000 g
NACIONAL	M5	15%+1%	750ml+0,045g	5000 g
	M5R1	15%+1%	750ml+0,045g	5000 g
CCN51	M6	15%+1%	750ml+0,045g	5000 g
	M6R1	15%+1%	750ml+0,045g	5000 g

Nota: Los mejores resultados tienen adición de un sustrato (Suero + *Lactobacillus spp*) en las concentraciones descritas en la tabla, las primeras muestras no llevan adición de sustrato para contrastar los resultados.

Para mayor comprensión describiremos el experimento.

- Cosechamos el cacao (Nacional y CCN-51) en 2 fincas distintas del recinto San Gerardo, cantón Echeandía y posteriormente se lo llevó al Centro de Acopio de cacao del Recinto San Gerardo para el tratamiento de post cosecha.
- Se lavó las mazorcas de cacao y se procedió a la extracción en recipientes debidamente lavados.
- Se procedió a pesar y depositar en cajas de madera con base perforada (malla de plástico) las muestras de cacao de acuerdo a lo mencionado en ***Tabla 17***.
- Se midió temperatura, grados Brix y pH de las muestras iniciales.
- Se tapó las cajas con hoja de plátano debidamente lavada y secada.
- Las cajas se las ubicó en un lugar adecuado para la fermentación con plástico debajo para el drenaje de la baba.
- A las 48 horas se añadió el sustrato en las concentraciones mencionadas en ***Tabla 17***.
- Cada 24 horas durante todo el proceso, se midió pH, grados Brix y temperatura de las muestras; además se removió el cacao para una adecuada fermentación.
- A las 168 horas se finalizó la fermentación, se puso el cacao en bolsas debidamente rotuladas y se las trasladó al Laboratorio de Investigación y Postgrado de la Universidad Estatal de Bolívar, para ser secadas en un secador de convección de aire por 48 horas a 45 ºC hasta llegar a la humedad requerida por la norma.

3.1.4.8.Preparación de la pasta de cacao

Procedimos al procesamiento del cacao para transformarlos en licor de cacao, bajo la norma NTE INEN 3187. A continuación, describiremos el proceso.

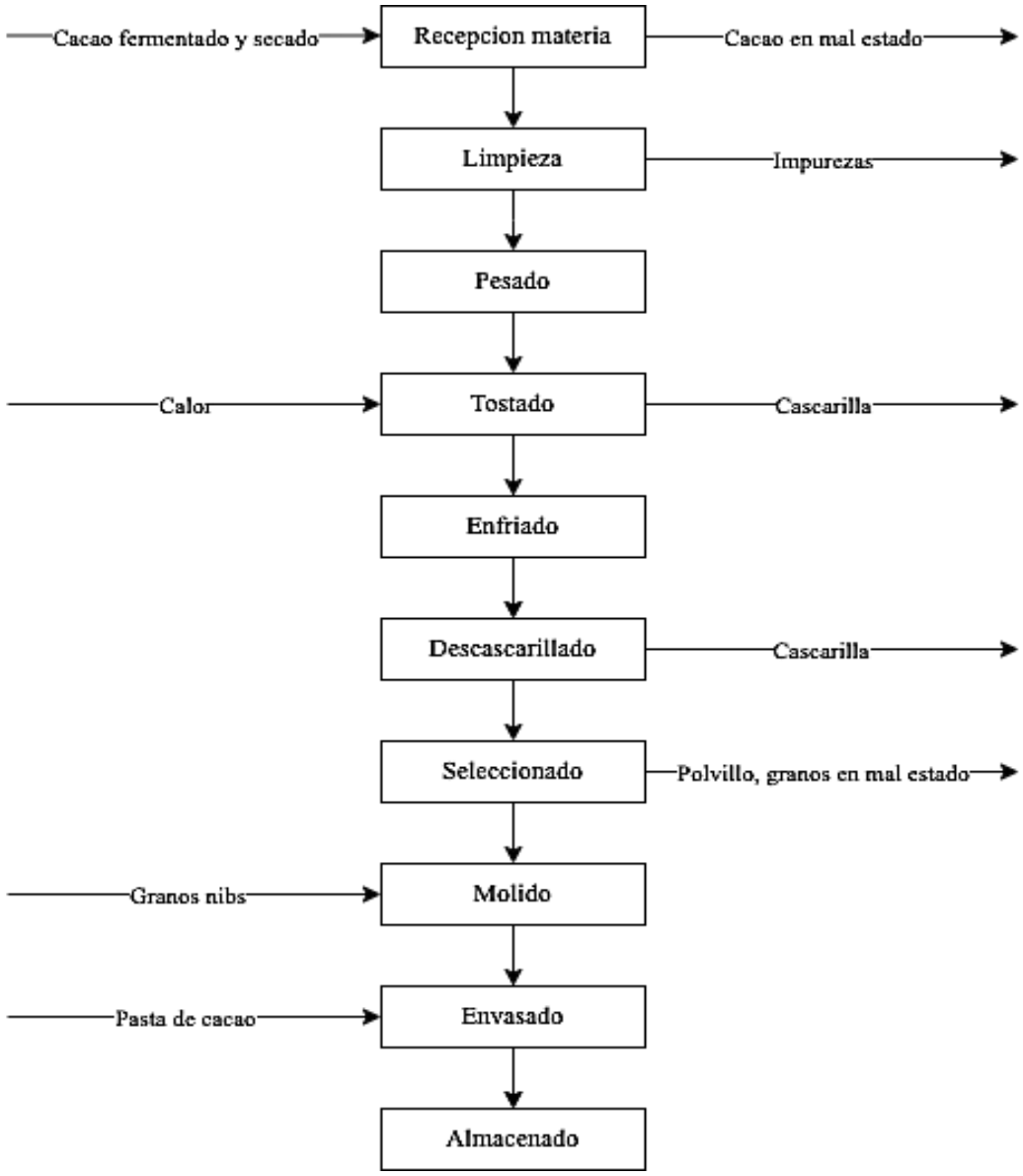
- **Recepción de la materia prima:** recibir, inspeccionar y registrar que los granos fermentados y previamente secados. Es una etapa crucial,

garantizando así la calidad y la trazabilidad de los granos de cacao que serán utilizados en la producción (Arvelo et al., 2017). Aquí se recibe los granos fermentados después de la adición del sustrato añadido para proceder con la obtención de la pasta de cacao.

- **Limpieza:** eliminar impurezas y materiales no deseados de los granos de cacao, es una etapa crucial ya que contribuye a garantizar la calidad y la pureza de los productos finales (Ortiz, 2020). En esta parte se retira cualquier tipo de partícula contaminante de los granos de cacao.
- **Pesado:** determinación y registro del peso del cacao. Se puede pesar por medio de balanzas para saber el peso inicial el proceso.
- **Tostado:** proceso por el cual se eleva la temperatura del cacao en una superficie caliente tostándolo y removiendo la cascara de la semilla. (Plúa, 2008).
- **Enfriado:** reducción de temperatura. Se procedió a esperar a que su temperatura disminuya para poder seguir procesando.
- **Descascarillado:** eliminación de la cáscara que envuelve los granos de cacao. Se puede realizar un tamizado adicional para eliminar cualquier fragmento de cascarilla remanente o impurezas que puedan haber quedado en el cacao.
- **Molido:** conversión de granos de cacao tostados en una pasta fina llamada licor de cacao. Este proceso de molido es fundamental para liberar los sabores y aromas del cacao, así como para obtener la textura y consistencia deseada en los productos de chocolate.
- **Envasado:** colocamos pasta de cacao en recipientes adecuados.
- **Almacenado**: el licor de cacao se ubicó a temperaturas y espacios adecuados para no dañar el producto.

Figura 3

Diagrama de proceso de elaboración de pasta de cacao.



3.1.4.8.1. Determinación alcaloides (cafeína y teobromina), polifenoles totales y grasa de la pasta de cacao

3.1.4.8.2. Cafeína

La cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) es una técnica de determinación de cafeína (IQB equipo de redacción, 2013)**.** A continuación, describiremos el proceso.

- Preparamos una alícuota de cafeína (1000 mg cafeína/L), para preparar unas disoluciones utilizables en una curva de calibración. (2, 10, 50, 100 y 250 ppm de cafeína (mg cafeína/L).
- Se peso 0,5g de muestra de cacao y se los coloco en matraces donde se añadió 0,5 g de Oxido de magnesio y 20 mL de agua destilada, se agito y calentó en un baño María por 20 minutos.
- Se centrifugaron y filtraron las muestras para luego preparar diluciones 1/10.
- Se traslado las diluciones a viales de cromatografía para ser utilizados en el HPLC.
- Se compara las curvas en los respectivos tiempos de retención con la del extracto puro de cafeína.

3.1.4.8.3. Teobromina

Los métodos más adecuados para determinar y cuantificar alcaloides presentes en frutas y verduras son los de (HPLC). A continuación, describiremos el proceso.

- Se hidrolizo muestras de pasta de cacao con cloruro de hidrogeno al 20 %, se dejó reposar por 2 horas a una temperatura de 90 °C.
- Se utilizo Cromatografía Liquida de Alta Eficacia de fase reversa, La columna utilizada fue una Zorbax, Agilent Eclipse Plus C18, 150 mm, de fase inversa, La fase móvil fue un solvente de sistema binario que consistió en: 1% ácido acético / agua y metanol.
- Se repitió el proceso de la determinación de cafeína.

3.1.4.9.Determinación de polifenoles totales

Se lo hizo por el método colorimétrico de Folin Ciocalteu. A continuación, describiremos el proceso.

- Para la curva ce calibración se utilizaron diluciones de ácido gálico 0,10 a 1,00 mg/mL. Se mezcló 20 µL de extracto con 1580 µL de agua desionizada y se añadió 100 µL de solución Folin Ciocalteau 2N.
- Se mezclo 300 µL de carbonato de sodio al 20% y se almacenó por 2 horas a temperatura ambiente.
- Se midió la absorbancia a una reflectancia de 700nm Los resultados se reportaron en g de ácido gálico/100 g de muestra sea.

3.1.4.10. Grasa

Se utilizó el mismo que en la caracterización proximal de la materia prima.

CAPITULO IV

4.1. RESULTADOS Y DISCUCIÓN

4.1.1. Caracterización físico-química y proximal de la materia prima

4.1.1.1. Cacao

La almendra de cacao fue caracterizada mediante análisis físico-químicos de acidez y pH, también por análisis proximales de grasa, proteína, humedad y cenizas.

Tabla 18

Análisis físico-químico y proximal para almendra de cacao (CCN-51 y Nacional).

Análisis	Almendra de cacao CCN-51	Almendra de cacao Nacional
Acidez	5,84 %	5,42 %
pH	4,58	5,14
Grasa	0,74%	1,45%
Proteína	14,29%	11,62%
Humedad	2,60%	2,11%
Cenizas	6,08%	6,29%

De la caracterización realizada se destaca que, la almendra de cacao CCN-51 tiene mayor porcentaje de proteína que la almendra de cacao Nacional, sin embargo, el cacao CCN-51 tiene un pH más acido que el Nacional.

Para Rivera (2018), las almendras de cacao tienen valores de pH entre 5,19 – 5,26; los valores reportados en esta investigación fueron de 4,58 para la variedad CCN-51 y 5,14 para la variedad Nacional, por tanto, este valor es considerable para la fermentación.

Según lo reportado por Chávez-Salazar et al. (2023), el cacao CCN-51 tiene un porcentaje de cenizas de 6,5%, pH de 5,22; proteína 13;2%, resultados similares fueron obtenidos en la presente investigación. Según Burbano (2020), el valor del pH para la variedad Nacional es de 5,27.

4.1.1.2. Mucílago

El mucílago de cacao fue caracterizado mediante análisis físico-químico de acidez y pH, también por análisis proximales de grasa, proteína, humedad y cenizas.

Tabla 19

Análisis físico-químico y proximal para el mucílago de cacao CCN-51 y Nacional

Análisis	Mucílago de cacao CCN-51	Mucílago de cacao Nacional
Acidez	1,433 %	0,963 %
pH	3,30	3,55
Grasa	-	-
Proteína	0,58%	0,89%
Humedad	4,02%	3,71%
Cenizas	6,12%	5,74%

***Nota*:** La grasa en el mucilago de cacao de las dos variedades resultó nula.

De la caracterización realizada se destaca que, el mucílago de cacao Nacional tiene mayor porcentaje de proteína que el mucílago de cacao CCN-51, sin embargo, la variedad CCN-51 es más ácida que el Nacional.

Para Garcés (2021), el valor del pH para el mucílago de cacao CCN-51, fue de 3,48; la acidez fue de 1;39%; en la presente investigación, los resultados para pH y acidez son similares. Según Zhunio (2020), los valores de pH para el mucílago de cacao Nacional, fue de 3,70; la proteína fue de 0,87%; cenizas 3;96%; resultados similares son expuestos en la presente investigación.

4.1.1.3. Suero de leche

Fue caracterizado mediante análisis físico-químicos de acidez y pH, también por análisis proximales de grasa, proteína, humedad y cenizas.

Tabla 20

Caracterización físico - químico y proximal del suero de leche

Análisis	Suero de leche
Acidez	5,84 %
pH	6,35
Grasa	-
Proteína	0,91%
Humedad	5,82%
Cenizas	5,85%

***Nota*:** La grasa en el suero de leche resultó nula.

El suero láctico utilizado en la investigación tiene una acidez elevada de 5,84%, pH de 6,35, humedad de 5,82% y cenizas de 5,85%; mientras que el contenido de proteínas es bajo de 0,91%.

Según lo reportado por Chacón et al. (2017), el porcentaje de proteína en el suero de leche es de 0,91 %, los resultados son de 0,91%, por tanto, se considera que el suero se encuentra en un estándar adecuado de proteína.

Según lo reportado por León (2019), el análisis físico-químico del suero de leche ácido para pH es de 4,80, acidez titulable (ac. láctico) 0,21; en cambio, para Arellano (2023), el suero tiene un pH de 5.1, para Romero (2019), el pH del suero es de 4.5, el porcentaje de grasa 0,6% y las proteínas 1,1%. Estos resultados difieren a lo presentado en la presente investigación.

4.1.2. Elaboración de los inóculos Modelo 1 y 2

Las cepas de *Acetobacter spp.,* y *Lactobacillus spp*., aisladas del mucílago de cacao fueron proporcionadas por las tesistas de la investigación "Aislamiento y caracterización del mucílago de cacao (*Theobroma cacao* L) y su uso en la agroindustria". Las bacterias liofilizadas se receptaron en un sobre metalizado.

4.1.2.1. Modelo 1 (Suero+ *Acetobacter spp*)

Tabla 21

Tratamientos para el sustrato a base de Suero de leche con Acetobacter spp.

(Suero + *Acetobacter*)	Tiempo (h)	pH	Grados Brix	Conteo de Colonias
5% + 0,1%	24	5,564	12	0
5% + 0,1%	48	5,232	12	0
5% + 0,1%	72	5,123	12	1
10% + 0,5%	24	5,555	6	0
10% + 0,5%	48	5,467	6	0
10% + 0,5%	72	5,987	6	0
15% + 1%	24	5,672	6	0
15% + 1%	48	5,111	6	1
15% + 1%	72	5,323	6	0
5% + 0,1%	24	5,442	12	0
5% + 0,1%	48	5,765	12	0
5% + 0,1%	72	5,987	12	2
10% + 0,5%	24	5,765	6	0
10% + 0,5%	48	6,986	6	0
10% + 0,5%	72	5,999	6	1
15% + 1%	24	6,212	6	0
15% + 1%	48	5,231	6	0
15% + 1%	72	5,876	6	0

La tabla ***Tabla 21*** muestra las combinaciones entre el factor Suero + *Acetobacter* y el factor tiempo, donde las variables respuestas es pH, grados Brix y conteo de colonias.

4.1.2.1.1. Análisis de Varianza para pH

Tabla 22

Análisis de Varianza para pH a base de Suero de leche con Acetobacter spp

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Efectos principales					
A:(Suero + *Acetobacter*)	0,697012	2	0,348506	1,56	0,2611 NS
B: Tiempo	0,0241643	2	0,0120822	0,05	0,9475 NS
INTERACCIONES					
AB	0,900909	4	0,225227	1,01	0,4508 NS
RESIDUOS	2,00444	9	0,222716		
TOTAL (CORREGIDO)	3,62653	17			

Nota: NS Diferencia Estadística no significativa

La ***Tabla 22*** presenta el ANOVA, donde los valores - p presentados no son menores 0,05, por tanto, ningún de los factores tiene un efecto estadísticamente significativo sobre pH con un 95,0% de nivel de confianza.

4.1.2.1.2. Análisis de Varianza para grados Brix

Tabla 23

Análisis de Varianza para grados Brix a base de Suero de leche con Acetobacter spp.

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Efectos principales					
A:(Suero + *Acetobacter*)	144,0	2	72,0		-
B: Tiempo	0	2	0		-
INTERACCIONES					-
AB	0	4	0		-
RESIDUOS	0	9	0		-
TOTAL (CORREGIDO)	144,0	17			-

La ***Tabla 23*** presenta el ANOVA, donde los valores - p presentados no son menores 0,05, por tanto, ningún de los factores tiene un efecto estadísticamente significativo sobre pH con un 95,0% de nivel de confianza.

4.1.2.1.3. Análisis de varianza para Conteo de Colonias

Tabla 24

Análisis de Varianza para conteo de colonias a base de Suero de leche con Acetobacter spp.

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Efectos principales					
A:(Suero + *Acetobacter*)	0,444444	2	0,222222	1,33	0,3111 NS
B: Tiempo	1,44444	2	0,722222	4,33	0,3481 NS
INTERACCIONES					
AB	2,22222	4	0,555556	3,33	0,0617 NS
RESIDUOS	1,5	9	0,166667		
TOTAL (CORREGIDO)	5,61111	17			

Nota: NS Diferencia estadística no significativa

La ***Tabla 24*** presenta el ANOVA, donde los valores - p presentados no son menores 0,05, por tanto, ningún de los factores tiene un efecto estadísticamente significativo sobre pH con un 95,0% de nivel de confianza.

4.1.2.2. Modelo 2 (Suero + *Lactobacillus spp*)

Tabla 25

Tratamientos para el sustrato a base de Suero de leche con Lactobacillus spp.

(Suero + *Lactobacillus*)	Tiempo	pH	Grados Brix	Conteo de Colonias
5% + 0,1%	24	5,676	6	63
5% + 0,1%	48	5,987	4	3
5% + 0,1%	72	5,111	4	131
10% + 0,5%	24	5,322	5	261
10% + 0,5%	48	5,612	5	5
10% + 0,5%	72	5,333	5	473
15% + 1%	24	5,909	7	467
15% + 1%	48	5,987	6	52
15% + 1%	72	6,121	6	611
5% + 0,1%	24	5,002	5	79
5% + 0,1%	48	5,098	5	10
5% + 0,1%	72	5,119	4	246
10% + 0,5%	24	5,343	5	201
10% + 0,5%	48	5,777	5	9
10% + 0,5%	72	5,009	5	356
15% + 1%	24	5,121	7	389
15% + 1%	48	6,879	7	79
15% + 1%	72	5,998	7	600

La ***Tabla 25*** muestra las combinaciones entre el factor Suero + *Lactobacillus* y el factor tiempo, donde las variables respuestas es pH, grados Brix y Conteo de colonias.

4.1.2.2.1. Análisis de Varianza para pH

Tabla 26

Análisis de Varianza para pH a base de Suero de leche con Lactobacillus spp.

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Efectos principales					
A: suero+*Lactobacillus*	1,63534	2	0,817668	5,24	0,0310*
B: Tiempo	0,884523	2	0,442261	2,83	0,1110 NS
INTERACCIONES					
AB	0,438297	4	0,109574	0,70	0,6099 NS
RESIDUOS	1,40452	9	0,156058		
TOTAL (CORREGIDO)	4,36268	17			

Nota: * Evidencia estadística significativa, NS diferencia estadística no significativa.

La ***Tabla 26*** presenta el ANOVA para pH donde destaca el valor-p es menor que 0,05, por tanto, el factor "suero + *Lactobacillus*" tiene un efecto estadísticamente significativo sobre pH con un 95,0% de nivel de confianza.

4.1.2.2.2. Pruebas de Múltiple Rangos para pH por Suero + *Lactobacillus spp*

Tabla 27

Método: 95,0 porcentaje LSD para pH por Suero + Lactobacillus

(Suero + *Lactobacillus*)	Casos	Media LS	Sigma LS	Grupos Homogéneos
5% + 0,1%	6	5,33217	0,161275	X
10% + 0,5%	6	5,39933	0,161275	X
15% + 1%	6	6,0025	0,161275	X

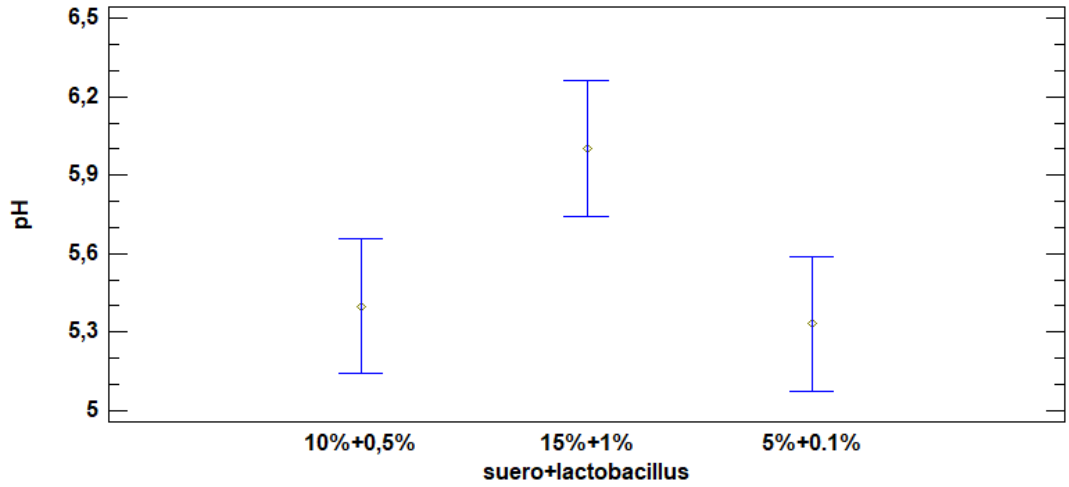
Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
10% + 0,5% - 15% + 1%	*	-0,603167	0,515948
10% + 0,5% - 5% + 0,1%		0,0671667	0,515948
15% + 1% - 5% + 0,1%	*	0,670333	0,515948

***Nota*: *** indica una diferencia significativa.

La ***Tabla 27*** indica la diferencia significativa entre los pares de medias, donde el contraste entre 10% + 0,5% y 15% + 1% tienen una diferencia de -0,603167; también, el contraste entre 15% + 1% y 5% + 0,1% tienen una diferencia significativa de 0,670333. El método empleado actualmente para discriminar entre las medias es el procedimiento de diferencia mínima significativa (LSD) de Fisher.

Figura 4

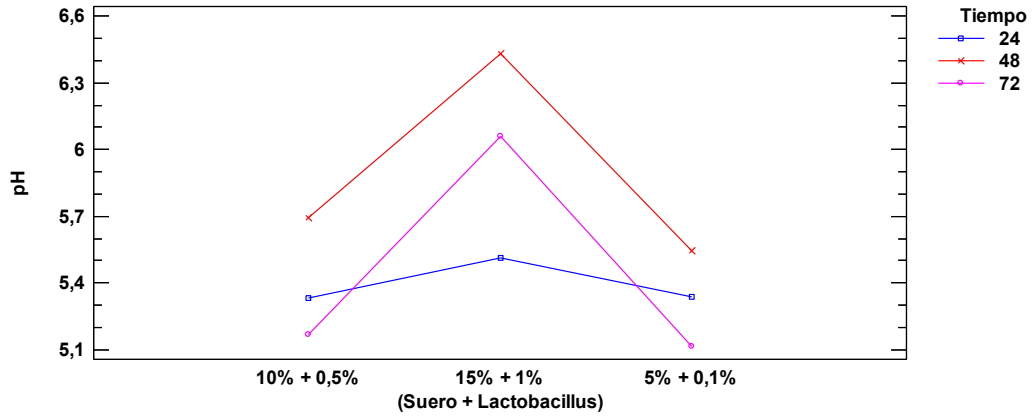
Gráfica de medias para suero + Lactobacillus en función a pH



La **Figura *4*** presenta la gráfica de medias para el sustrato a base de suero de leche con *Lactobacillus spp.,* en función a pH, donde destaca la concentración de 15% de suero +1% de bacteria, siendo este nivel el más significativo.

Figura 5

Gráfico de interacciones entre (Suero + Lactobacillus) para pH



La **Figura 5** presenta la gráfica de interacciones entre el sustrato a base de suero de leche con *Lactobacillus spp.,* en función a pH y el tiempo, donde destaca que la concentración de 15% de suero +1% de bacteria, en un tiempo de 48 horas tiene un aumento de pH, siendo esta interacción la más significativa.

4.1.2.2.3. Análisis de Varianza para grados Brix

Tabla 28

Análisis de Varianza para grados Brix a base de Suero de leche con Lactobacillus spp.

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Efectos principales					
A: suero+*Lactobacillus*	13,7778	2	6,88889	31,00	0,0001**
B: Tiempo	1,44444	2	0,722222	3,25	0,0866 NS
INTERACCIONES					
AB	1,22222	4	0,305556	1,38	0,3165 NS
RESIDUOS	2,0	9	0,222222		
TOTAL (CORREGIDO)	18,4444	17			

Nota: ** Evidencia estadística altamente significativa, NS diferencia estadística no significativa.

La ***Tabla 28*** presenta el ANOVA para grados Brix donde destaca el valor-p es menor que 0,05; por tanto, el factor "suero + *Lactobacillus*" tiene un efecto estadísticamente significativo sobre pH con un 95,0% de nivel de confianza.

4.1.2.2.4. Pruebas de Múltiple Rangos para grados Brix por (Suero + *Lactobacillus spp*)

Tabla 29

Método: 95,0 porcentaje LSD para grados Brix por Suero + Lactobacillus

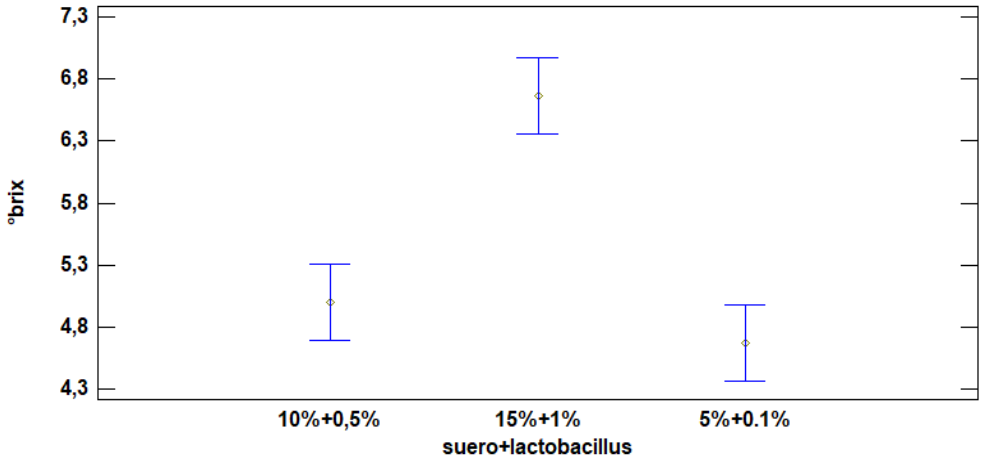
(Suero + *Lactobacillus*)	Casos	Media LS	Sigma LS	Grupos Homogéneos
5% + 0,1%	6	4,66667	0,19245	X
10% + 0,5%	6	5,0	0,19245	X
15% + 1%	6	6,66667	0,19245	X
Contraste	**Sig.**	**Diferencia**	**+/- Límites**	
10% + 0,5% - 15% + 1%	*	-1,66667	0,615683	
10% + 0,5% - 5% + 0,1%		0,333333	0,615683	
15% + 1% - 5% + 0,1%	*	2,0	0,615683	

***Nota*:** * indica una diferencia significativa.

La ***Tabla 29*** indica la diferencia significativa entre los pares de medias, donde el contraste entre 10 %+0,5% y 15% + 1% tienen una diferencia de -1,66667; también, el contraste entre 15% + 1% y 5 % + 0,1% tienen una diferencia significativa de 2,0. El método empleado actualmente para discriminar entre las medias es el procedimiento de diferencia mínima significativa (LSD) de Fisher.

Figura 6

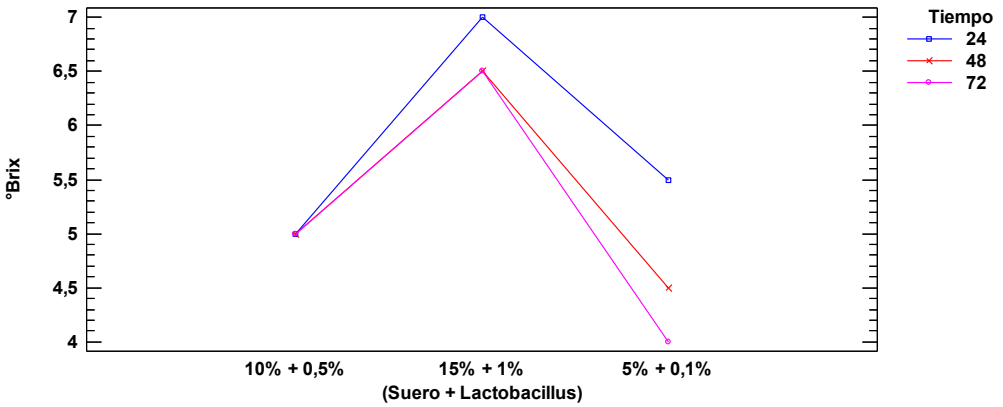
Gráfica de medias para Suero + Lactobacillus en función a grados Brix



La ***Figura 6*** presenta la gráfica de medias para el sustrato a base de suero de leche con *Lactobacillus spp, en* función a grados Brix, donde destaca la concentración de 15% de suero +1% de bacteria, siendo este nivel el más significativo.

Figura 7

Gráfica de medias para Suero + Lactobacillus en función a grados Brix



La **Figura 7** presenta la gráfica de interacciones entre el sustrato a base de suero de leche con *Lactobacillus spp,* en función a grados Brix y el tiempo, donde destaca que la concentración de 15% de suero +1% de bacteria, en un tiempo de 24 horas tiene un aumento en los grados Brix, siendo esta interacción más significativa.

En el estudio realizado por Estivariz (2023), abordó la optimización de la producción de bebidas de suero de leche con *Lactobacillus casei* y sabor a copoazú, mediante pruebas de mezclas, resultando en una formulación con un 20% de copoazú y un 80% de suero de leche, incubada a 38°C durante 6 horas.

Se controló la fermentación para mantener la calidad del producto, demostrando que esta formulación mantuvo su calidad organoléptica y viabilidad microbiana durante 28 días.

4.1.2.2.5. Análisis de Varianza para Conteo de colonias

Tabla 30

Análisis de Varianza para Conteo de colonias a base de Suero de leche con Lactobacillus spp.

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Efectos principales					
A: suero + *Lactobacillus*	231696,	2	115848,	55,21	0,0000**
B: Tiempo	428563,	2	214281,	102,12	0,0000**
INTERACCIONES					
AB	75108,7	4	18777,2	8,95	0,0034*
RESIDUOS	18884,5	9	2098,28		
TOTAL (CORREGIDO)	754253,	17			

Nota: ** Evidencia estadística altamente significativa y * evidencia estadística significativa

La ***Tabla 30*** presenta el ANOVA para pH donde destaca tres valor-p son menores a 0,05; por tanto, los factores que tienen significancia es el factor "suero + *Lactobacillus*", "Tiempo" y la interacción de estos dos factores, que tienen diferencia estadísticamente significativa sobre conteo de colonias con un 95,0% de nivel de confianza.

4.1.2.2.6. Pruebas de Múltiple Rangos para Conteo de colonias por (Suero + Lactobacillus)

Tabla 31

Método: 95,0 porcentaje LSD para Conteo de colonias por Suero + Lactobacillus

(Suero + *Lactobacillus*)	Casos	Media LS	Sigma LS	Grupos Homogéneos
5% + 0,1%	6	88,6667	18,7006	X
10% + 0,5%	6	217,5	18,7006	X
15% + 1%	6	366,333	18,7006	X

Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
10% + 0,5% - 15% + 1%	*	-148,833	59,8266
10% + 0,5% - 5% + 0,1%	*	128,833	59,8266
15% + 1% - 5% + 0,1%	*	277,667	59,8266

Nota: * indica una diferencia significativa.

La ***Tabla 31*** indica la diferencia significativa entre los tres pares de medias, donde la diferencia del primer par es de -148,833; el segundo par tiene un valor de 128,833 y, el tercer par registra un valor de 277,667. El método empleado actualmente para

discriminar entre las medias es el procedimiento de diferencia mínima significativa (LSD) de Fisher.

4.1.2.2.7. Pruebas de Múltiple Rangos para Conteo de colonias por Tiempo

Tabla 32

Método: 95,0 porcentaje LSD para Conteo de colonias por Tiempo

Tiempo	Casos	Media LS	Sigma LS	Grupos Homogéneos
48	6	26,3333	18,7006	X
24	6	243,333	18,7006	X
72	6	402,833	18,7006	X

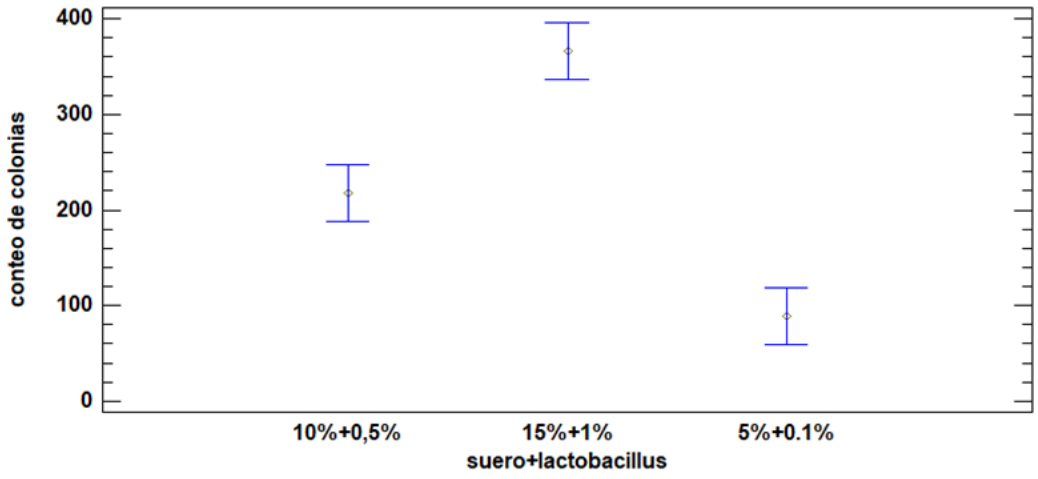
Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
24 - 48	*	217,0	59,8266
24 - 72	*	-159,5	59,8266
48 - 72	*	-376,5	59,8266

Nota: * indica una diferencia significativa.

La ***Tabla 32*** indica la diferencia significativa entre los tres pares de medias, donde la diferencia del primer par es de 217,0; el segundo par tiene un valor de -159,5 y, el tercer par registra un valor de -376,5. El método empleado actualmente para discriminar entre las medias es el procedimiento de diferencia mínima significativa (LSD) de Fisher.

Figura 8

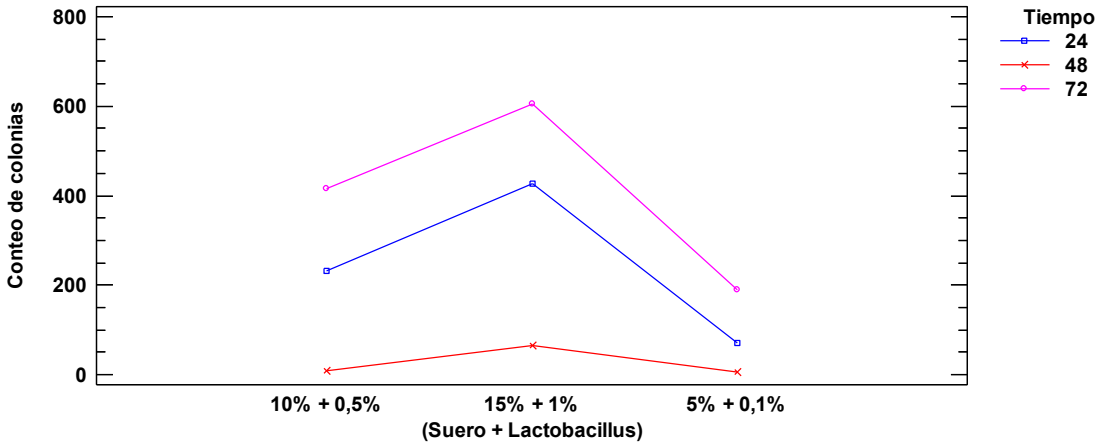
Gráfica de medias para suero + Lactobacillus en función a Conteo de colonias



La ***Figura 8*** presenta la gráfica de medias para el sustrato a base de suero de leche con *Lactobacillus spp.,* en función a conteo de colonias, donde destaca la concentración de 15% de suero +1% de bacteria, en un tiempo de 72 horas, siendo este nivel el más significativo, seguido de la concentración 10% + 0,5%.

Figura 9

Gráfico de interacciones entre (Suero + Lactobacillus), conteo de colonias y tiempo



La ***Figura 9*** presenta la gráfica de interacciones entre el sustrato a base de suero de leche con *Lactobacillus spp.,* en función a conteo de colonias y el tiempo, donde destaca que la concentración de 15% de suero +1% de bacteria, en un tiempo de 72 horas tiene un aumento en el número de conteo de colonias, siendo esta interacción más significativa.

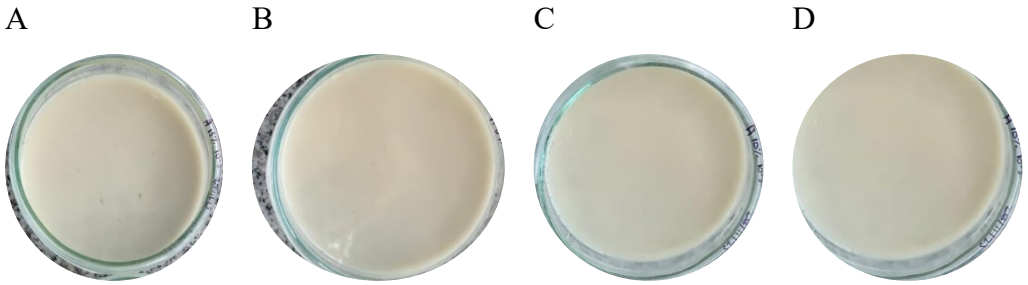
4.1.3. Caracterización de los inóculos

4.1.3.1.Modelo 1 (Suero+ *Acetobacter spp*)

No se realizó la caracterización de *Acetobacter spp* (Tinción de Gram, prueba de Catalasa y conteo UFC/ml) ya que en la placa ya que no se obtuvo crecimiento.

Figura 10

Placas con medio GYC sembradas con sustrato Modelo 1 (Suero + Acetobacter spp)



Nota: La imagen A -B – C- D corresponden a la siembra en agar GYC del sustrato con *Acetobacter spp.*,

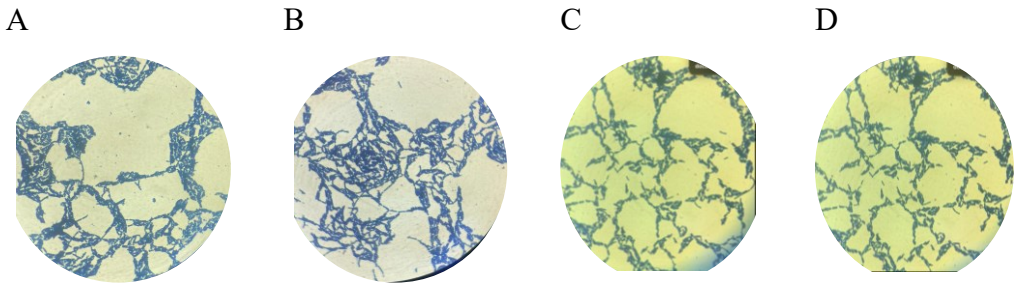
4.1.3.1.1. Modelo 2 (Suero + *Lactobacillus spp*)

Se realizó la caracterización al suero de leche enriquecido con *Lactobacillus spp*., mediante tinción de Gram, catalasa y conteo bacteriano (UFC/ml) a las muestras de sustrato Modelo 2 (Suero + *Lactobacillus spp*).

4.1.3.2.1 Tinción de Gram

Figura 11

Caracterización mediante tinción de Gram al sustrato a base de suero de leche adicionado Lactobacillus spp.



Nota: La imagen A corresponde a la codificación "BACSR1" que significa Bacterias aisladas cacao con suero replica 1; La imagen B corresponde a BACSR2: Bacterias aisladas cacao con suero replica 2. La imagen C corresponde a BASSR1: Bacterias aisladas cacao sin suero replica 1. La imagen D corresponde a BASSR2: Bacterias aisladas cacao sin suero replica 2.

La ***Figura 11*** presenta los resultados para la caracterización del sustrato con *Lactobacillus spp*., es gran positiva, con morfología de bacilos y cocos.

Según (Mori, 2021), se identificó una cepa gran positiva, la **Figura *12*** bacterias anaerobias, prueba catalasa negativa, bacterias no esporuladas de forma bacilos. Según la identificación realizada con el API 50 CH se trata de una cepa de *Lactobacillus acidophillus* con un 97% de confianza.

Figura 12

Caracterización de Lactobacillus por tinción de Gram



Nota: Imagen tomada de (Mori, 2021)

4.1.3.2.2. Prueba de Catalasa

La prueba de catalasa, que resulto se ser gran positiva, característico de *Lactobacillus.*

4.1.3.2.3. Conteo Bacteriano (UFC/ml)

Tabla 33
Conteo bacteriano Modelo 2

Muestra	Tiempo (h)	UFC/ml	Promedio Ufc/ml
M1	0	0	
M2	0	0	0
M3	0	0	
M1	24	1040,3	
M2	24	251,1	477,2279336
M3	24	140,3	
M1	48	1431655765,3	
M2	48	858993459,2	791081583,2
M3	48	82595524,9	
M1	72	2148663944356,2	
M2	72	595084517358,7	1,37187E+12
M3	72	Incontable	

En la ***Tabla 33*** observamos el crecimiento fue progresivo a lo largo de 72 horas (tiempo estimado de vida de *Lactobacillus spp*).

4.1.4. Modelo 3 (Fermentación de cacao CCN-51 y nacional en laboratorio)

Tabla 34
Tratamientos para el proceso de fermentación a escala laboratorio

Variedad de Cacao	Tipo de sustrato	Tiempo (h)	pH	Grados brix	Color de almendra
Nacional	S+*L*	24	3,78	17	2
Nacional	S+*L*	48	3,91	17	1
Nacional	S+*L*	72	3,8	11	0
Nacional	S+*A*	24	3,61	9	0
Nacional	S+*A*	48	3,45	8	0
Nacional	S+*A*	72	3,5	8	0
Nacional	S+*L*+*A*	24	3,68	16	2
Nacional	S+*L*+*A*	48	3,57	14	2
Nacional	S+*L*+*A*	72	3,57	10	2
CCN-51	S+*L*	24	3,5	17	0
CCN-51	S+*L*	48	3,26	14	0
CCN-51	S+*L*	72	3,15	9	0
CCN-51	S+*A*	24	3,6	9	1
CCN-51	S+*A*	48	3,49	8	1

CCN-51	S+*A*	72	3,47	8	1
CCN-51	S+*L*+*A*	24	3,39	14	2
CCN-51	S+*L*+*A*	48	3,19	12	2
CCN-51	S+*L*+*A*	72	3,18	10	2
Nacional	S+*L*	24	3,76	13	0
Nacional	S+*L*	48	3,74	10	0
Nacional	S+*L*	72	3,67	9	0
Nacional	S+*A*	24	3,77	8	2
Nacional	S+*A*	48	3,56	7	1
Nacional	S+*A*	72	3,63	6	2
Nacional	S+*L*+*A*	24	3,77	16	2
Nacional	S+*L*+*A*	48	3,54	13	2
Nacional	S+*L*+*A*	72	3,61	10	2
CCN-51	S+*L*	24	3,43	10	0
CCN-51	S+*L*	48	3,37	10	1
CCN-51	S+*L*	72	3,2	9	0
CCN-51	S+*A*	24	3,5	9	2
CCN-51	S+*A*	48	3,45	9	2
CCN-51	S+*A*	72	3,41	9	2
CCN-51	S+*L*+*A*	24	3,44	14	2
CCN-51	S+*L*+*A*	48	3,37	11	1
CCN-51	S+*L*+*A*	72	3,71	9	2
Nacional	S+*L*	24	3,91	15	0
Nacional	S+*L*	48	3,85	11	1
Nacional	S+*L*	72	3,76	9	2
Nacional	S+*A*	24	3,7	11	1
Nacional	S+*A*	48	3,61	10	1
Nacional	S+*A*	72	3,51	9	1
Nacional	S+*L*+*A*	24	3,95	10	1
Nacional	S+*L*+*A*	48	3,89	9	2
Nacional	S+*L*+*A*	72	3,81	8	2
CCN-51	S+*L*	24	3,62	15	0
CCN-51	S+*L*	48	3,44	11	0
CCN-51	S+*L*	72	3,27	9	0
CCN-51	S+*A*	24	3,46	13	2
CCN-51	S+*A*	48	3,41	10	1
CCN-51	S+*A*	72	3,4	9	2
CCN-51	S+*L*+*A*	24	3,51	16	2
CCN-51	S+*L*+*A*	48	3,38	16	2
CCN-51	S+*L*+*A*	72	3,36	11	2

Nota: En el apartado color de almendra, el numero 0 corresponde a bueno, el 1 a regular y el 2 a malo.

4.1.4.1. Análisis de Varianza para pH

Tabla 35

Análisis de Varianza para pH en el proceso de fermentación

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-p
Efectos principales					
A: Variedad de cacao	1,17042	1	1,17042	92,82	0,0000**
B: Tipo de sustrato	0,0221148	2	0,0110574	0,88	0,4248
C: Tiempo	0,174959	2	0,0874796	6,94	0,0028*
INTERACCIONES					
AB	0,2199	2	0,10995	8,72	0,0008**
AC	0,00247778	2	0,00123889	0,10	0,9067 NS
BC	0,0459074	4	0,0114769	0,91	0,4684 NS
ABC	0,0596556	4	0,0149139	1,18	0,3348 NS
RESIDUOS	0,453933	36	0,0126093		
TOTAL (CORREGIDO)	2,14936	53			

Nota: ** Evidencia estadística altamente significativa y * evidencia estadística significativa, evidencia estadística no significativa.

La ***Tabla 35*** ANOVA para pH, donde hay tres valores-p que son menores que 0,05, estos factores tienen un efecto estadísticamente significativo sobre pH con un 95,0% de nivel de confianza. Los efectos principales son variedad de cacao y tiempo, además de la interacción entre variedad de cacao y tipo de sustrato.

4.1.4.2. Pruebas de Múltiple Rangos para pH por Variedad de Cacao

Tabla 36

Método: 95,0 porcentaje LSD para pH por Variedad de Cacao

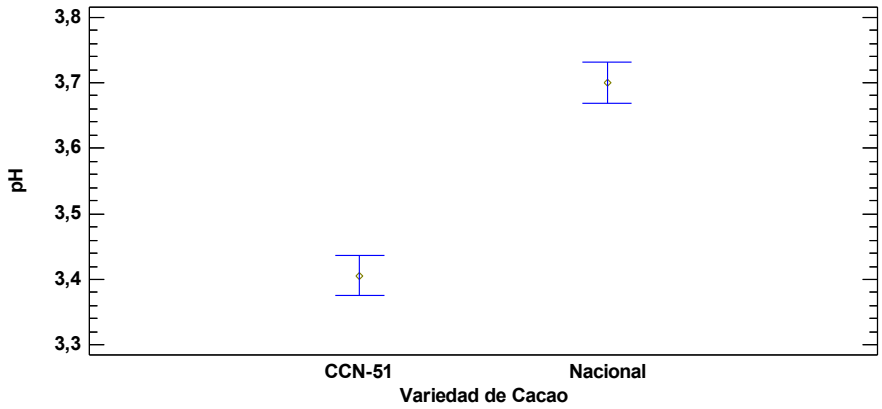
Variedad de Cacao	Casos	Media LS	Sigma LS	Grupos Homogéneos
CCN-51	27	3,40593	0,0216104	X
Nacional	27	3,70037	0,0216104	X
Contraste	**Sig.**	**Diferencia**	**+/- Límites**	
CCN-51 - Nacional	*	-0,294444	0,0619822	

Nota: * indica una diferencia significativa.

La **Tabla 36** indica la diferencia significativa entre la variedad de cacao CCN-51 y Nacional, donde el valor es de -0,294444.

Figura 13

Gráfica de medias pH por variedad de cacao en el proceso de fermentación



La ***Figura 13*** indica que la variedad de cacao Nacional tiene efecto sobre el pH, a diferencia del cacao CCN-51.

4.1.4.3. Pruebas de Múltiple Rangos para pH por Tiempo

Tabla 37

Método: 95,0 porcentaje LSD para pH por Tiempo

Tiempo	Casos	Media LS	Sigma LS	Grupos Homogéneos
72	18	3,50056	0,0264672	X
48	18	3,52667	0,0264672	X
24	18	3,63222	0,0264672	X

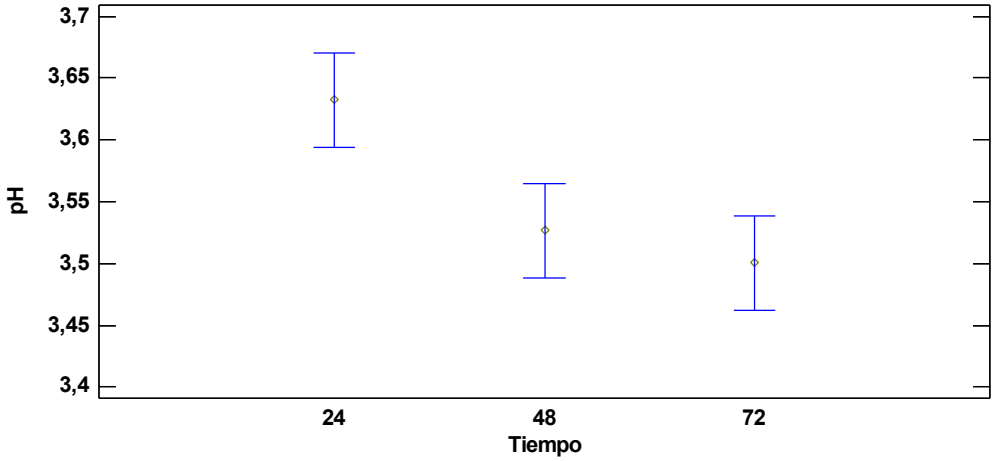
Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
24 - 48	*	0,105556	0,0759124
24 - 72	*	0,131667	0,0759124
48 - 72		0,0261111	0,0759124

Nota: * indica una diferencia significativa.

La ***Tabla 37*** indica la diferencia significativa de tiempo de fermentación entre 24 – 48 horas, donde el valor es de 0,105556 y el tiempo de fermentación entre 48 – 72 horas, donde el valor es de 0,131667.

Figura 14

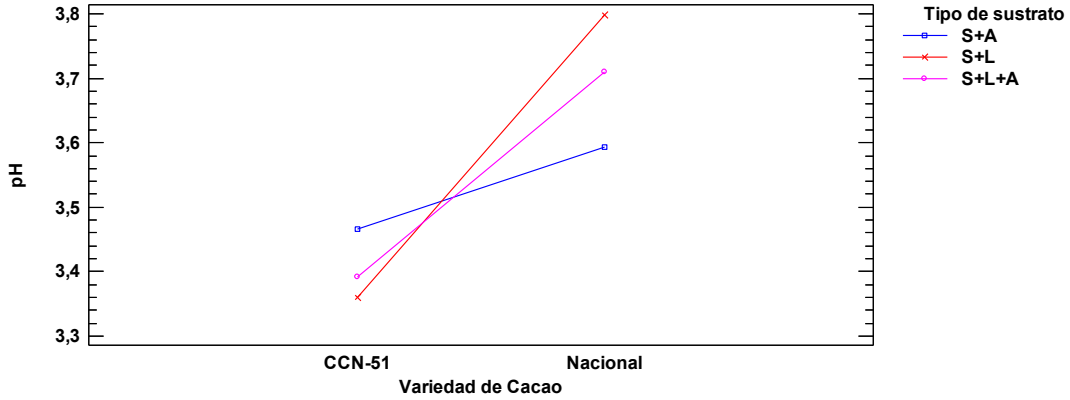
Gráfica de pH por tiempo en el proceso de fermentación



La ***Figura 14*** indica que a las 24 horas hay efecto sobre el pH, a diferencia de las horas 48 y 72.

Figura 15

Gráfico de interacciones variedad de cacao por tipo de sustrato en relación a pH



La ***Figura 15*** indica que, con el cacao Nacional, con el tipo de sustrato de suero de leche con *Lactobacillus spp*., tienen influencia sobre el pH.

4.1.4.4. Análisis de Varianza para grados Brix

Tabla 38

Análisis de Varianza para grados Brix en el proceso de fermentación

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-p
Efectos principales					
A: Variedad de Cacao	0,907407	1	0,907407	0,20	0,6548
B: Tipo de sustrato	122,704	2	61,3519	13,75	0,0000**
C: Tiempo	132,481	2	66,2407	14,84	0,0000**
INTERACCIONES					
AB	8,92593	2	4,46296	1,00	0,3779 NS
AC	0,037037	2	0,0185185	0,00	0,9959 NS
BC	22,963	4	5,74074	1,29	0,2936 NS
ABC	0,296296	4	0,0740741	0,02	0,9994 NS
RESIDUOS	160,667	36	4,46296		
TOTAL (CORREGIDO)	448,981	53			

Nota: ** Evidencia estadística altamente significativa, NS diferencia estadística no significativa.

La ***Tabla 38***, presenta el ANOVA para grados Brix, se destaca que dos valores-p son menores que 0,05, estos factores tienen un efecto estadísticamente significativo sobre grados Brix con un 95,0% de nivel de confianza.

4.1.4.5. Pruebas de Múltiple Rangos para grados brix por Tipo de sustrato

Tabla 39

Método: 95,0 porcentaje LSD para grados brix por Tipo de sustrato en el proceso de fermentación

Tipo de sustrato	Casos	Media LS	Sigma LS	Grupos Homogéneos
S+A	18	8,88889	0,497938	X
S+L	18	12,0	0,497938	X
S+L+A	18	12,1667	0,497938	X

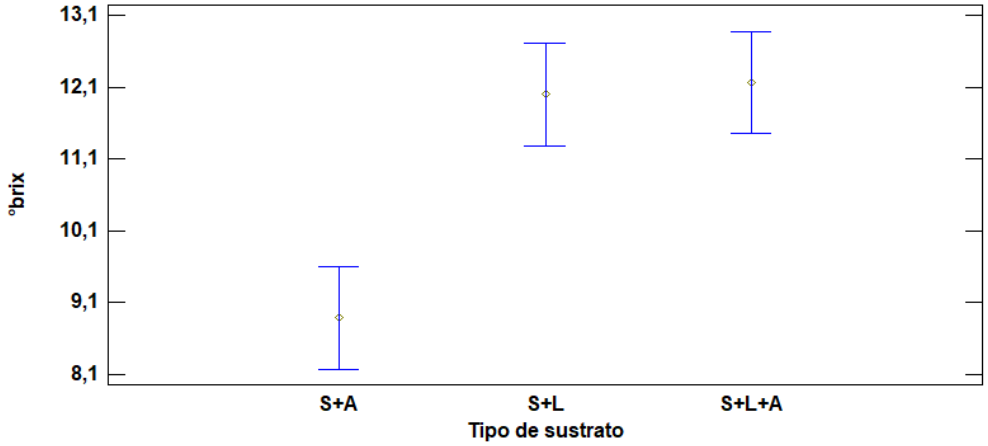
Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
S+A - S+L	*	-3,11111	1,42817
S+A - S+L+A	*	-3,27778	1,42817
S+L - S+L+A		-0,166667	1,42817

Nota: * indica una diferencia significativa.

La ***Tabla 39*** indica la diferencia significativa del tipo de sustrato, entre Suero + *Acetobacter spp.*, y Suero + *Lactobacillus spp*., donde el valor es de -3,11111 y entre Suero + *Lactobacillus spp*., y Suero + *Lactobacillus spp., + Acetobacter spp* donde el valor es de -3,27778.

Figura 16

Gráfico de medias grados Brix por tipo de sustrato en el proceso de fermentación



La ***Figura 16***, exhibe, que el sustrato de suero de leche con *Lactobacillus spp* tiene mayor influencia sobre los grados Brix, en relación al suero de leche con *Acetobacter spp.*

4.1.4.6. Pruebas de Múltiple Rangos para grados Brix por Tiempo

Tabla 40

Método: 95,0 porcentaje LSD para grados Brix por Tiempo

Tiempo	Casos	Media LS	Sigma LS	Grupos Homogéneos
72	18	9,05556	0,497938	X
48	18	11,1111	0,497938	X
24	18	12,8889	0,497938	X

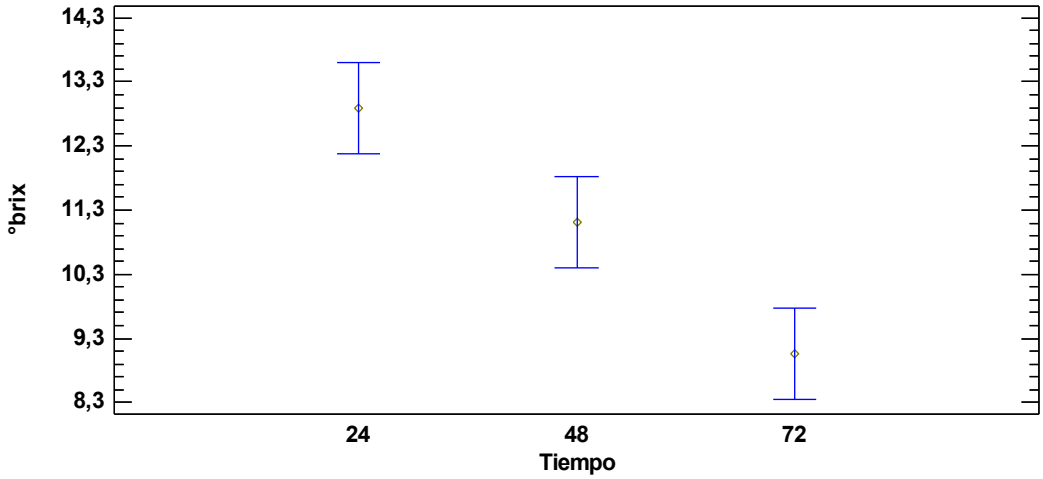
Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
24 - 48	*	1,77778	1,42817
24 - 72	*	3,83333	1,42817
48 - 72	*	2,05556	1,42817

Nota: * indica una diferencia significativa.

La ***Tabla 40*** indica la diferencia significativa entre los distintos tiempos de fermentación, todos tienen significancia.

Figura 17

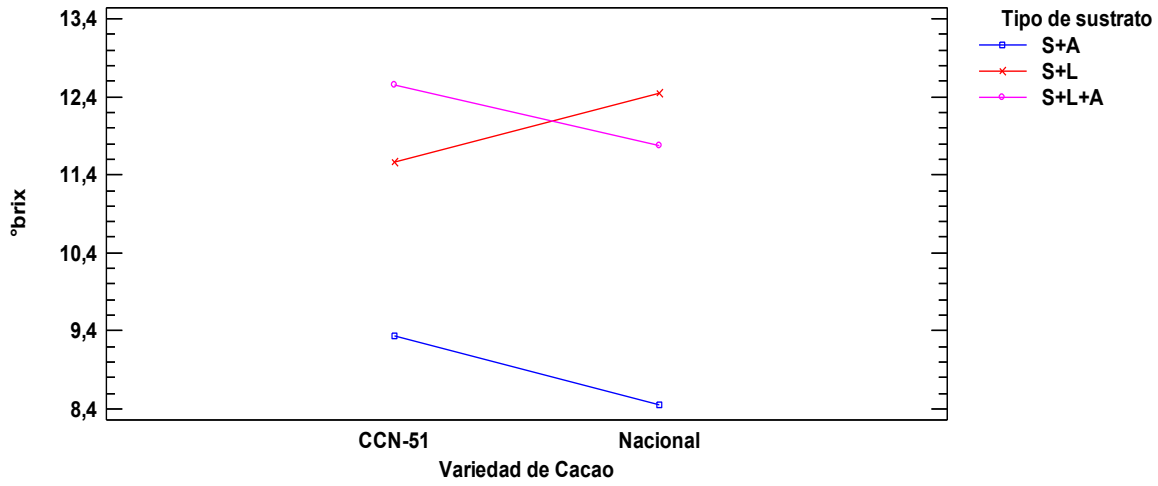
Gráfico de medias grados Brix por tiempo en el proceso de fermentación



La ***Figura 17***, exhibe, que el tiempo tiene mayor influencia sobre grados Brix, en relación al suero de leche con *Acetobacter spp.*

Figura 18

Gráfica de interacciones entre variedad de cacao y grados Brix



4.1.4.7. Análisis de Varianza para Color de almendra

Tabla 41

Análisis de Varianza para conteo de colonias en el proceso de fermentación

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-p
Efectos principales					
A: Variedad de Cacao	0,0185185	1	0,0185185	0,05	0,8324 NS
B: Tipo de sustrato	20,3333	2	10,1667	24,95	0,0000**
C: Tiempo	0,111111	2	0,0555556	0,14	0,8730 NS
INTERACCIONES					
AB	3,37037	2	1,68519	4,14	0,0242*
AC	0,037037	2	0,0185185	0,05	0,9556 NS
BC	0,555556	4	0,138889	0,34	0,8485 NS
ABC	0,407407	4	0,101852	0,25	0,9078 NS
RESIDUOS	14,6667	36	0,407407		
TOTAL (CORREGIDO)	39,5	53			

Nota: ** Evidencia estadística altamente significativa y * evidencia estadística significativa, NS diferencia estadística no significativa.

La ***Tabla 41***, presenta el ANOVA para conteo de colonias, se destaca que dos valores-p son menores que 0,05, estos factores tienen un efecto estadísticamente significativo sobre conteo de colonias con un 95,0% de nivel de confianza. Los efectos principales son Tipo de sustrato y la interacción entre variedad de cacao y tipo de sustrato.

4.1.4.8. Pruebas de Múltiple Rangos para Color de almendra por Tipo de sustrato

Tabla 42

Método: 95,0 porcentaje LSD

Tipo de sustrato	Casos	Media LS	Sigma LS	Grupos Homogéneos
S+L	18	0,388889	0,150445	X
S+A	18	1,22222	0,150445	X
S+L+A	18	1,88889	0,150445	X

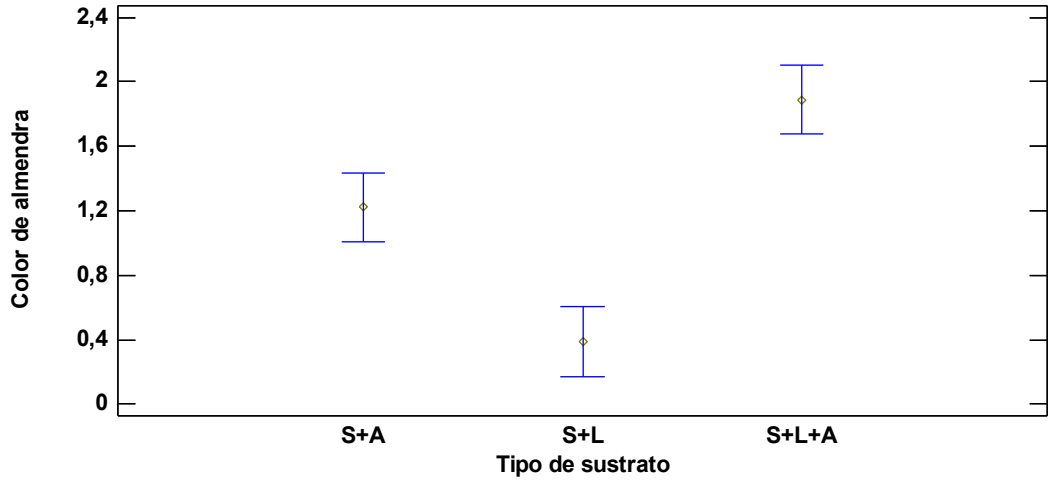
Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
S+A - S+L	*	0,833333	0,431501
S+A - S+L+A	*	-0,666667	0,431501
S+L - S+L+A	*	-1,5	0,431501

Nota: * indica una diferencia significativa.

La ***Tabla 42*** indica la diferencia significativa entre los distintos tipos de sustrato, todos, influyendo sobre el color de la almendra.

Figura 19

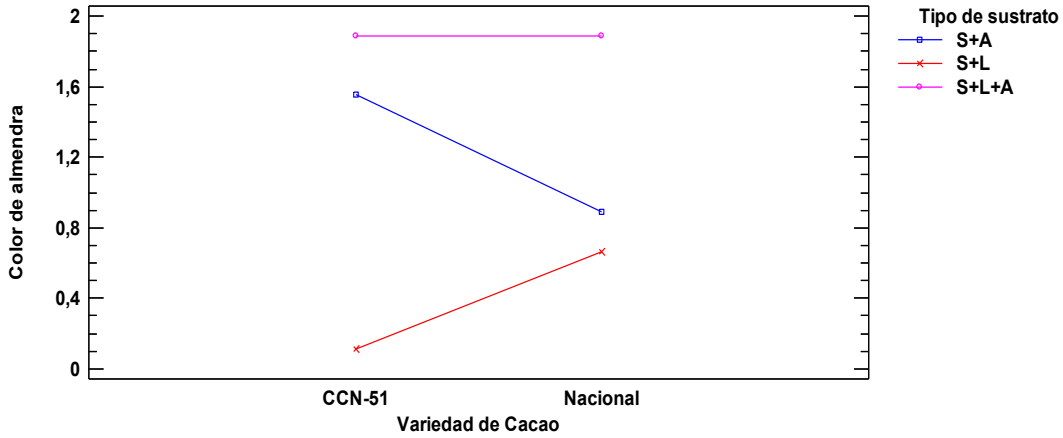
Gráfico de medias color de la almendra por tipo de sustrato en el proceso de fermentación



La ***Figura 19*** , exhibe, que el sustrato de suero de leche con *Lactobacillus spp +Acetobater spp.* tiene mayor influencia sobre el color de la almendra, en relación al resto de sustratos.

Figura 20

Gráfico de interacciones variedad de cacao por tipo de sustrato en relación a color de la almendra



La ***Figura 20*** indica que, con el cacao Nacional, con el tipo de sustrato de suero de leche con *Lactobacillus spp. + Acetobacter spp*., tienen influencia sobre el color de la almendra.

4.1.5. Análisis de fermentación a escala laboratorio de cacao (Nacional y CCN-51)

4.1.5.1. Prueba de corte

Tabla 43

Tabla de corte de grano de los mejores resultados obtenidos en laboratorio.

Variedad de cacao	Muestra	Prueba de corte escala laboratorio con 100 g de cacao
CACAO NACIONAL	M1 sin sustrato	
CACAO CCN-51	M2 sin sustrato	
CACAO NACIONAL	M4 S+L	
CCN-51	M5 S+L	
CCN-51	M6 S + L	

Nota: Se añadió a los mejores resultados obtenidos las muestras fermentadas sin adición de sustratos.

En la prueba de corte presentada en la ***Tabla 43*** muestra los resultados.

4.1.5.2. Humedad

Tabla 44

Tabla de humedad (inicial y final) de las muestras fermentadas a escala laboratorio.

Muestra		Humedad antes de secado (%)	Humedad después de secado (%)
CACAO NACIONAL	M1 sin sustrato	72,66	14,59
CACAO CCN-51	M2 sin sustrato	76,89	12,75
	M4 S+*L*	72,76	9,79
CACAO NACIONAL	M5 S+*L*	75,69	9,35
	M6 S+*L*	76,11	8,87
	M7 S+*L*	76,84	10,37
CACAO CCN-51	M8 S+*L*	76,74	7,83
	M9 S+*L*	75,18	9,04
	M10 S+*A*	80,12	12,18
CACAO NACIONAL	M11 S+*A*	75,11	11,61
	M12 S+*A*	77,13	11,54
	M13 S+*A*	82,06	11,25
CACAO CCN-51	M14 S+*A*	86,62	12,83
	M15 S+*A*	75,14	13,32
	M16 S+*L*+*A*	72,28	10,89
CACAO NACIONAL	M17 S+*L*+*A*	75,98	11,81
	M18 S+*L*+*A*	78,12	14,06
	M19 S+*L*+*A*	80,78	9,89
CACAO CCN-51	M20 S+*L*+*A*	76,29	11,51
	M21 S+*L*+*A*	76,42	14,37

Nota: La codificación M + número corresponde al número de muestra, mientras que las letras S corresponden a sustrato, la *L* a *Lactobacillus spp* y la *A* a *Acetobacter spp*.

La **Tabla 44** evidencia el adecuado proceso de secado de las muestras en porcentajes de humedad. El cacao beneficiado no debe estar infestado (Pérez, 2009), no existió granos infestados.

La muestran no debe exceder 1% de granos defectuosos (Pérez, 2009), el 99% de granos estaban en un buen estado.

No debe presentar olores desagradables diferentes a los de la fermentación (descomposición, pesticidas u otros que sean no habituales) (Pérez, 2009). Los olores presentes son agradables, no presentan aromas a contaminación ni podridos.

El cacao beneficiado está sujeto a normas FAO/OMS, en relación a límites recomendados de aflatoxinas, plaguicidas y metales pesados (Pérez, 2009).

El cacao utilizado para este proceso fue netamente de la comunidad de San Gerardo, completamente natural sin aflatoxinas, plaguicidas y metales pesados ya que estas son sustancias dañinas para la salud humana y el medio ambiente.

Debe estar libre de impurezas (Pérez, 2009)**,** el 99% del cacao está libre de Impurezas y materias extrañas.

4.1.6. Fermentación de los mejores resultados en el recinto San Gerardo

Nos trasladamos al recinto San Gerardo, cantón Echeandía, donde pusimos en marcha el proceso.

La fermentación se la realizó en cajas de madera de 60 cm de largo por 40 cm de ancho y 20 cm de profundidad. Las cajas tenían en su base malla de plástico para el drenado. El cacao durante la fermentación fue cubierto con hoja de plátano para conservar su temperatura y como protección para agentes externos.

Tabla 45

Manejo del experimento a escala piloto

Muestras	Codificación	Concentración S+L	Concentración de S+L	Peso cacao
NACIONAL	M1	Sin sustrato	Sin sustrato	5000 g
	M1R1	Sin sustrato	Sin sustrato	5000 g
CCN51	M2	Sin sustrato	Sin sustrato	5000 g
	M2R1	Sin sustrato	Sin sustrato	5000 g
NACIONAL	M3	10%+0,5%	500ml+0,03g	5000 g
	M3R1	10%+0,5%	500ml+0,03g	5000 g
CCN51	M4	10%+0,5%	500ml+0,03g	5000 g
	M4R1	10%+0,5%	500ml+0,03g	5000 g
NACIONAL	M5	15%+1%	750ml+0,045g	5000 g
	M5R1	15%+1%	750ml+0,045g	5000 g
CCN51	M6	15%+1%	750ml+0,045g	5000 g
	M6R1	15%+1%	750ml+0,045g	5000 g

Nota: La letra S corresponde a sustrato, la letra L corresponde a *Lactobacillus spp*.

En la ***Tabla 45*** podemos visualizar la distribución de las muestras en relación a la cantidad de cacao y sustrato a utilizarse, con sus respectivas replicas.

Durante un periodo de 168 horas se fermentó, removió y monitoreo (pH, temperatura y grados Brix) el cacao para controlar una adecuada fermentación.

Tabla 46
Monitoreo fermentación hora 0

Muestra	Temperatura (ºC)	pH	Grados Brix
Nacional sin sustrato	27,2	3,795	16
CCN sin sustrato	27,1	3,415	17
Nacional al 10%	27,6	4,315	15,5
CCN al 10%	26,85	3,26	16,5
Nacional al 15%	26,6	3,73	15
CCN al 15%	26,8	3,785	17

En la ***Tabla 46*** se muestran los datos con los que el cacao empieza su fermentación a escala piloto.

Tabla 47
Monitoreo de la fermentación hora 72, 24 horas después de la adición del sustrato

Muestra	Temperatura (ºC)	pH	Grados Brix
Nacional sin sustrato	31,85	5,32	9
CCN sin sustrato	34,3	3,015	10
Nacional al 10%	39	3,47	8
CCN al 10%	38,5	3,91	10
Nacional al 15%	33,35	4,47	10
CCN al 15%	38,45	3,685	10

En la **Tabla 47** observamos el monitoreo correspondiente a la hora 72, es importante destacar este día porque son 24 horas después de añadir los sustratos a la fermentación de cacao, podemos observar un incremento de la temperatura y descenso de grados brix en las muestras.

Tabla 48
Monitoreo de la fermentación hora 168, finalización de la fermentación

Muestra	Temperatura (ºC)	pH	Grados Brix
Nacional sin sustrato	25,15	5,295	4,5
CCN sin sustrato	25,55	5,6	4,5
Nacional al 10%	25,55	5,715	4
CCN al 10%	25,3	5,1	4,5
Nacional al 15%	24,55	5,47	4,5
CCN al 15%	25,85	5,55	4

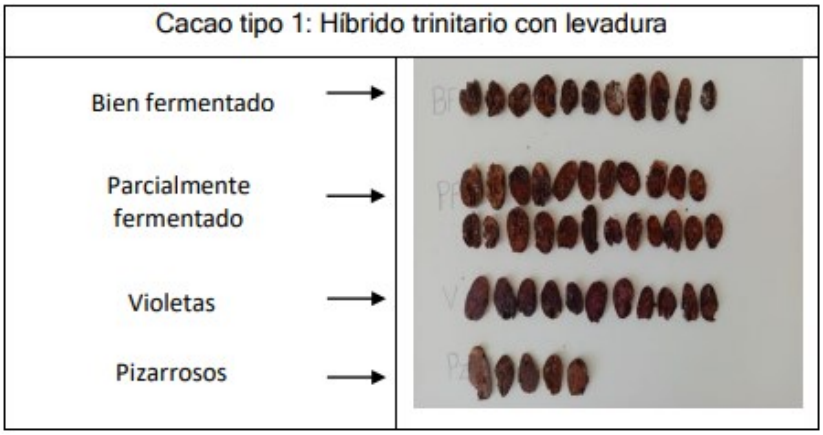
En la ***Tabla 48*** observamos el ultimo monitoreo de fermentación, donde podemos destacar la baja de pH y una estabilización en la temperatura, lo que indica que existió un decremento de consorcios de microorganismos en las muestras,

Según Mori (2021), menciona que el índice de fermentación de la muestra de cacao nativo fino de aroma, alcanzó un valor de 1,05; lo que señala la consecución de un proceso de fermentación óptimo, que realzan los atributos sensoriales y físicos del cacao, manifestándose en tonos marrones que oscilan entre claro y oscuro.

Según lo reportado por Murcia (2022), las pruebas de corte del cacao híbrido trinitario testigo, mostró un 8% de granos bien fermentados, con una mayoría de granos parcialmente fermentados y pizarrosos, indicando una fermentación incompleta y menor calidad. En contraste, el híbrido trinitario con levadura exhibió un mayor porcentaje de granos bien fermentados y menos granos violetas y pizarrosos, una mejor calidad y sabor del cacao. Por último, el híbrido trinitario sin levadura presentó un alto porcentaje de granos parcialmente fermentados, lo que afecta el desarrollo completo del sabor a cacao, aunque mostró una reducción en los granos violetas y pizarrosos, evitando sabores amargos y astringentes en el grano.

Figura 22

Prueba de corte



Nota: imagen tomada de (Murcia, 2022)

4.1.7. Resultados (alcaloides, polifenoles y grasa) de la pasta de cacao

Una vez preparada la pasta de cacao se procedió a enviar las muestras al laboratorio INIAP (Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias) para realizar los

análisis de alcaloides, polifenoles y grasa de las muestras de pasta de cacao provenientes de la fermentación a escala piloto.

4.1.7.1. Polifenoles

Tabla 49

Análisis de polifenoles de la pasta de cacao

Tipo de muestra	Método de referencia	Resultado	Unidad
Nacional sin sustrato	Cross, E. y Maringo, G. 1973/1982	72,61	mg Ac. Gálico/g
CCN sin sustrato	Cross, E. y Maringo, G. 1973/1982	89,58	mg Ac. Gálico/g
Nacional al 10%	Cross, E. y Maringo, G. 1973/1982	80,86	mg Ac. Gálico/g
CCN al 10%	Cross, E. y Maringo, G. 1973/1982	85,34	mg Ac. Gálico/g
Nacional al 15%	Cross, E. y Maringo, G. 1973/1982	80,39	mg Ac. Gálico/g
CCN al 15%	Cross, E. y Maringo, G. 1973/1982	79,29	mg Ac. Gálico/g

Nota: La tabla presenta los análisis promedio de la muestra inicial y la réplica.

La ***Tabla 49*** muestra los resultados de las concentraciones de polifenoles presentes en las muestras, donde se destaca la muestra de cacao CCN-51 sin uso de sustrato con la cantidad de polifenoles más elevada, seguida por CCN-51 con un sustrato de 10% de suero + 0,5% de *Lactobacillus spp*.

Los resultados expuestos por Penagos (2019), menciona que la concentración media de polifenoles en los granos fermentados en cajones llenos es inferior (108 mg ácido gálico/gramo) en comparación con aquellos fermentados en cajones al 50% (132 mg ácido gálico/gramo). Asimismo, según Yánez (2020), durante la fermentación, se observaron cambios en la concentración de polifenoles totales, donde el cacao Nacional fluctuó de 44,29 ± 6,90 en el inicio a 36,78 ± 5,06 al final, por otro lado, en CCN-51, la concentración varió de 42,31 ± 2,33 al principio a 41,87 ± 7,80 en el cuarto día.

4.1.7.2. Alcaloides

4.1.7.2.1. Teobromina

Tabla 50

Análisis de Teobromina de la pasta de cacao

Tipo de muestra	Método de referencia	Resultado	Unidad
Nacional sin sustrato	AOAC 980.14-1998	2,14	%
Pasta de Cacao M2	AOAC 980.14-1998	1,59	%
CCN sin sustrato	AOAC 980.14-1998	1,72	%
Pasta de Cacao M4	AOAC 980.14-1998	1,57	%
Nacional al 10%	AOAC 980.14-1998	1,65	%
Pasta de Cacao M6	AOAC 980.14-1998	1,61	%

Nota: La tabla presenta los análisis promedio de la muestra inicial y la réplica.

La ***Tabla 50*** muestra la concentración de Teobromina presente en las muestras donde cabe destacar que la muestra con mayor concentración de Teobromina es M1 que corresponde a cacao nacional sin uso de sustratos, la que le sigue es M3 correspondiente a cacao nacional con un sustrato de 10% de suero + 0,5% de *Lactobacillus spp*.

Para teobromina, Mori (2021), dice que le porcentaje de teobromina en muestras de cacao fermentado, alcanza 4,89 g/100 g cacao, para la concentración de cafeína, obtuvo un valor de 1,81 g/100 g cacao, tanto la teobromina y cafeína, son responsables de la amargura del cacao.

4.1.7.2.2. Cafeína

Tabla 51

Análisis de Cafeína de la pasta de cacao

Tipo de muestra	Método de referencia	Resultado	Unidad
Nacional sin sustrato	IOCC 37-1990	52,365	%
CCN sin sustrato	IOCC 37-1990	54,87	%
Nacional al 10%	IOCC 37-1990	53,995	%
CCN al 10%	IOCC 37-1990	53,16	%
Nacional al 15%	IOCC 37-1990	51,875	%
CCN al 15%	IOCC 37-1990	52,69	%

Nota: La tabla presenta los análisis promedio de la muestra inicial y la réplica.

La ***Tabla 51*** presenta porcentajes de Cafeína presentes en las muestras donde se destaca la muestra con mayor concentración de Cafeína que corresponde a cacao

nacional sin uso de sustratos, la que le sigue correspondiente a cacao nacional con un sustrato de 10% de suero + 0,5% de *Lactobacillus spp*.

Según (Zambrano et al., 2010) cantidades totales (cafeína, teobromina y teofilina) en cacao: un 2,38% de teobromina y 0,02%.

4.1.7.3. Grasa

Tabla 52

Análisis de grasa de la pasta de cacao

Tipo de muestra	Método de referencia	Resultado	Unidad
Nacional sin sustrato	IOCC 37-1990	52,365	%
CCN sin sustrato	IOCC 37-1990	54,87	%
Nacional al 10%	IOCC 37-1990	53,995	%
CCN al 10%	IOCC 37-1990	53,16	%
Nacional al 15%	IOCC 37-1990	51,875	%
CCN al 15%	IOCC 37-1990	52,69	%

Nota: La tabla presenta los análisis promedio de la muestra inicial y la réplica.

La ***Tabla 52*** presenta los porcentajes de grasa presentes en las muestras donde no observamos diferencias significativas entre las muestras, sin embargo, la que mayor concentración presenta corresponde al cacao CCN-51 sin adición de sustrato.

Según (Zambrano et al., 2010) el cacao en Zea tiene mayores índices de grasa (cercano al 53%), y el CM en SJL tiene índices menores al 50%.

4.2. COMPROBACIÓN HIPÓTESIS

4.2.1. Hipótesis Nula

La adición de bacterias acido lácticas y acéticas no influye en la calidad final de la pasta de cacao (*Theobroma Cacao* L.) Nacional y CCN-51.

4.2.2. Hipótesis Alterna

La adición de bacterias acido lácticas y acéticas influye en la calidad final de la pasta de cacao (*Theobroma Cacao* L.) Nacional y CCN-51.

4.2.3. Comprobación de la hipótesis

Se acepta la hipótesis alterna, debido a que en el manejo del experimento Modelo 3 (fermentación en laboratorio), obtuvimos evidencia estadística significativa y altamente significativa.

CAPITULO V

5.1. CONCLUSIONES

- Se caracterizó de acuerdo a la normativa sugerida para cada proceso, cacao (Nacional y CCN-51) tanto mucílago como almendra y suero de leche mediante análisis físico químico y proximal para garantizar la calidad de la materia prima a utilizar en el experimento.
- Los resultados para el diseño experimental modelo 1 y 2, el uso de *Acetobacter spp* solo o combinado no presentaron evidencia estadística significativa, por tanto, se concluyó que no es adecuado para el uso en un sustrato a base de suero láctico. Para *Lactobacillus spp* se concluyó que es favorable por su evidencia estadística significativa para todas las variables respuestas (grados brix, pH y conteo colonias) el factor suero + *Lactobacillus spp al 15% y 1%* muestra evidencia estadística altamente significativa.
- Los resultados para el diseño experimental modelo 3, el sustrato a base de suero + *Lactobacillus spp* mostró resultados favorables tanto en pruebas sensoriales (aromas a caramelo y yogurt) como en estadísticas de lo cual se desprendieron los mejores resultados (para cacao nacional y CCN-51 al 10% y 15% de sustrato).
- Se realizo el proceso de fermentación con los mejores resultados en el recinto San Gerardo, cantón Echeandía, donde se monitoreó diariamente las muestras (pH, grados Brix y temperatura) y se determinó que la temperatura es la característica de monitoreo más importante para saber cuándo agregar las bacterias a usarse (entre 20 y 25°C) y cuando termina el tiempo de fermentación (Una vez que disminuye la temperatura al terminar la fase termófila, con temperaturas que alcanzan los 50°C).
- Se preparó la pasta o licor de cacao de acuerdo a lo fijado en la norma NTE INEN 3187, y al final de la preparación de la pasta se obtuvo sensorialmente aromas y sabores deseados como aroma a leche, baja astringencia y reducción de amargor en algunas muestras.

- Se realizó los análisis de la pasta o licor de cacao, con el cacao fermentado en el recinto San Gerardo y los resultados destacables son; en polifenoles M2 (CCN-51 sin sustrato) con 89,58 mg A. gálico/g, Podemos decir que se presentó una disminución en relación al que no contenía inoculación. Para teobromina, M1 (cacao nacional sin sustrato) con 2,14%. Podemos decir que de igual manera presenta una disminución en relación al q no utilizo inoculación. Para cafeína, M1 (cacao Nacional sin sustrato) con 0,43%. Para grasa los resultados son bastante parejos siendo el de mayor contenido M3 (Nacional al 10%). En base a los resultados presentados podemos decir que bajo el amargor y la astringencia por la disminución de polifenoles y alcaloides y aumentaron los aromas a lácteos por la producción de ácido láctico inducido por las BAL.

5.2. RECOMENDACIONES

- Es importante explorar alternativas adicionales de sustratos que puedan potenciar la fermentación deseada. Se debe considerar la viabilidad y efectividad de cada sustrato, así como su disponibilidad y costo., además se podría realizar pruebas adicionales con diferentes combinaciones de sustratos y microorganismos para obtener una comprensión más completa de sus efectos en la fermentación del cacao.
- Investigar métodos para mejorar el control de los factores ambientales durante el escalamiento del proceso, como el uso de invernaderos o sistemas de control de temperatura.
- Explorar técnicas para minimizar la interferencia de agentes externos durante el proceso de fermentación a gran escala. Considerar la implementación de estándares de inocuidad más estrictos y protocolos de control de calidad para garantizar la seguridad y la consistencia del producto final.
- Continuar refinando el proceso de preparación de la pasta de cacao para optimizar la calidad sensorial del producto final, explorando técnicas adicionales, como la variación en el tiempo y la temperatura de tostado, para mejorar aún más el aroma y el sabor de la pasta de cacao.
- Investigar las posibles razones detrás de la falta de aumento significativo en los polifenoles, teobromina y cafeína al agregar sustratos durante el proceso de fermentación, realizando análisis adicionales para identificar otros compuestos bioactivos presentes en la pasta de cacao que puedan contribuir a sus propiedades nutricionales y sensoriales.

BIBLIOGRAFÍA

Agroequipos de Valle. (2018). *Los sustratos agrícolas y sus propiedades*.

Arellano, D. (2023). *Concentrado en polvo para preparar bebidas a base de semilla de guayaba (Psidium guajava L.)y suero de leche*. Universidad de Ciencias y Artes de Chiapas.

Arvelo, M., González, D., Maroto, S., Delgado, T., & Montoya, P. (2017). *Manual Técnico del Cultivo de Cacao Buenas Prácticas para América Latina* (Arvelo Miguel, Ed.; IICA).

Burbano, R. (2020). *Evaluación de un sistema semiautomatizado para la fermentación de Theobroma cacao L. (Nacional y Súper árbol) en la Amazonía Norte Ecuatoriana*. Universidad Estatal Amazónica .

Cabdy, J. (2019). *¿Qué Sucede Durante la Fermentación Del Cacao?* Perfect Daily Grind.

CAMAE, C. marítima del E. (2022, September 14). *El cacao ecuatoriano es valorado por su calidad y su sabor*.

Chacon, L., Chávez, A., Rentería, A., & Rodríguez, J. (2019). Proteínas del lactosuero: usos, relación con la salud y bioactividades. *INTERCIENCIA*, *42*(11), 712–718.

Chávez-Salazar, A., Guevara-Pérez, A., Encina-Zelada, C., Vidaurre-Rojas, P., & Muñoz-Delgado, V. (2023). Condiciones de fermentación y secado en las características físico químicas del cacao (Theobroma cacao L.) Cultivar CCN 51. *Revista Agro tecnológica Amazónica*, *3*(2), 1–21. https://doi.org/10.51252/raa.v3i2.555

Compañía Nacional de Chocolates S.A.S. (2019). *Cosecha, beneficio y calidad del grano de cacao*. Https://Chocolates.Com.Co/Wp-Content/Uploads/2019/09/Cartilla-Cosecha-Benef-Calidad-SEP-2019.Pdf. https://chocolates.com.co/wp-content/uploads/2019/09/Cartilla-Cosecha-Benef-Calidad-SEP-2019.pdf

Contreras, M. (2024). *Elaboración de películas comestibles a partir de suero de leche fermentado por bacterias acido lácticas.* Benemérita Universidad Autónoma de Puebla.

Corrales, L., Caycedo, L., & Quijano, S. (2022). Catalisis, enzimas y pruebas rápidas. *Nova*, *20*.

Erazo Solórzano, C. Y., Bravo Franco, K. J., Tuárez García, D. A., Fernández Escobar, Á. O., Torres Navarrete, Y. G., & Vera Chang, J. F. (2021). Efecto de la fermentación de cacao (theobroma cacao L.), variedad nacional y trinitario, en cajas de maderas no convencionales sobre la calidad física y sensorial del licor de cacao. *Revista de Investigación Talentos*, *8*(2), 42–55. https://doi.org/10.33789/talentos.8.2.153

Estivariz, K. (2023). *Formulación de una bebida probiótica a base de suero de leche y pulpa de copoazú*. Universidad Mayor de San Andrés.

Fajardo, C., Peralta, U., Garcia, S., & Hartel, R. (2019). Optimización de la formulación de chocolate oscuro a partir de la mezcla de granos de cacao y contenido de cacao aplicando método de superficie de respuesta. *Enfoque UTE*, *10*.

Ferreira, L., Vega, S., Sanchez, F., Gonzales, M., Herrer, A., & Muñiz, C. (n.d.). Identificacio´n bacteriana mediante espectrometrı´a de masasmatrix-assistedlaser desorption ionization time-of-flight. Comparacio´n con la metodologı´ahabitual en los laboratorios de Microbiologı´a Clı´nica. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*.

Flores, L., Ruiz, A., & Oscanoa, A. (2021). Protocolo para determinación de cenizas en microalgas liofilizadas. *Inf Inst Mar Perú* , *48*(0378–7702).

Garcés, B. (2021). *Evaluación de las diferentes proporciones de mucílago de cacao (Theobroma cacao L.) CCN51 y jugo de caña de azúcar (Saccharum Officinarum L.) En la elaboración de jalea*. Universidad Nacional de Ucayali.

García, A., Pico, B., & Jaimez, R. (2021). La cadena de producción del Cacao en Ecuador: Resiliencia en los diferentes actores de la producción. *Revista Digital Novasinergia*, *4*(ISSN 2631-2654).

García, D. (2019). *¿Qué es el pH?* Cuaderno de Cultura Científica. https://culturacientifica.com/2019/11/28/que-es-el-ph/

Garcia, E., & Fernandez, I. (2019). *Determinación de la humedad de un alimento por un método gravimétrico indirecto por desecación.*

García, T., Papalexandratou, Z., Hendryckx, H., Camu, N., & Vrancken, G. (2020). Diversity of the total bacterial community associated with Ghanaian and Brazilian cocoa bean fermentation samples as revealed by a 16 S rRNA gene clone library. *Appl Microbiol Biotechnol*, *6*, 87–92.

Gutiérrez, H., & De la Vara, R. (2019). *Análisis y diseño de experimentos* (Ricardo A. del Bosque Alayón, Ed.; Segunda Edición). McGRAW-HILL/INTERAMERICANA EDITORES, S.A.

Hernandez, A. (2020). *Incorporación de compuestos bioactivos de mucílago de cacao*. Universidad Técnica Estatal de Quevedo.

INEN. (2019). *Productos vegetales y de frutas – determinación de la acidez titulable (idt)*.

IQB equipo de redacción. (2013). *Vademecun Instituto de Química y Biología*.

Jaimez, R., Barragan, L., Fernandez, M., Wessjohann, L., George, C., & Sotomayor, I. (2022). Theobroma cacao L. cultivar CCN 51: a comprehensive review on origin, genetics, sensory properties, production dynamics, and physiological aspects. *Plant Biology* . https://doi.org/10.7717/peerj.12676

Jimenez, A., & Vélez, A. (2022). Tinción de Gram de tejido: alcances y limitaciones. *Microbiología*, *1*.

Jordan, K., & Parra, M. del C. (2020). *Evaluación del mucilago de cacao (Theobroma Cacao L) para la obtención de etanol de segunda generación* [Titulo de Ingenieria en Alimentos]. Universidad Técnica de Machala.

Lallemand Brewing. (2024). *¿Qué es la acidez titulable?* Measuring Titratable Acidity. https://www.lallemandbrewing.com/es/south-america/recursos/el-rincon-del-cervecero/calculadoras-para-el-proceso-cervecero/medir-la-acidez-titulable/

Leon, P. (2019). *Diseño de una bebida de lactosuero y tomate de árbol (Cyphomandra Betacea) estabilizada con linaza (Linum Usitatissimum)*. Universidad Técnica de Machala.

Loo, J. (2019). *Variación de la conductividad eléctrica del medio acuoso por inmersión de granos de cacao CCN-51 con diferentes indices de fermentación* [Título de Ingeniero en Industrias Alimentarias]. Universidad Nacional Agraria La Molina .

Lozano, R., García, Y., Barral, D., & Farral, M. (2019). Cafeína: un nutriente, un fármaco, o una droga de abuso. *Revista Adicciones*, *19*(0214–4840).

Maldonado, A. (2023). *Determinación de características morfoagronómicas en el cultivo de cacao criollo (Theobroma cacao L.) Establecido en la Estación Experimental y de Practicas de la Facultad de Ciencias Agronómicas*. Universidad de El Salvador.

Marquez, M. (2014). *Refrigeración y congelación de alimentos: terminología, definiciones y explicaciones*. Universidad Nacional de San Agustin.

Martinez, J., Rubio, M., & Aredes, P. (2022). *Fermentación Maloláctica: Desarrollo de un cultivo iniciador de Oenococcus oeni* (1st ed., Vol. 1). Editorial Académica Española.

Medina, D. (2020). *",Modificación bioquímica del cotiledón de cacao (theobroma cacao l) en la etapa de postcosecha con la adición de levadura (saccharomyces cerevisiae) y enzima (polifenol oxidasa) para mejorar su calidad."* Universidad Tecnica Estatal de Quevedo.

Moran, P. (2019). *CUANTIFICACIÓN DE POLIFENOLES TOTALES EN HOJAS DE Mauria heterophylla*. Universidad Católica los Angeles .

Mori, D. (2021). *Estandarización de la fermentación de cacao (Theobroma cacao) nativo fino de aroma para la sostenibilidad de su procesamiento en la provincia de Utcubamba, Amazonas*. Universidad Nacional Toribio Rodríguez de Mendoza de Amazonas.

Murcia, L. (2022). *Fermentación de cacao bajo condiciones de laboratorio utilizando granos secos y pulpa artificial para mejorar las características organolépticas de semillas de cacao (Theobroma Cacao L.) mal fermentadas en finca*. Universidad de El Salvador.

Ordoñez, E., León, A., & Rivera, H. (2019). Cuantificación de polifenoles totales y capacidad antioxidante en cáscara y semilla de cacao (Theobroma cacao L.), tuna (Opuntia ficus indica Mill), uva (Vitis Vinífera) y uvilla (Pourouma cecropiifolia). *Scientia Agropecuaria*, *10*(2077–9917).

Ortiz, K., & Guilcapi, M. (2020). *Manual de procesos de centro de acopio de cacao*.

Penagos, A. (2019). *Estandarización del proceso de fermentación de cacao (Theobroma cacao L.) en función de la relación entre la masa de grano y el volumen del cajón fermentador*. Universidad Nacional de Colombia.

Pérez, R. (2019). *La Calidad del Cacao*. INIAP.

Plúa, J., & Cornejo, F. (2020). Diseño de una procesadora de Pasta de Cacao Artesanal (Theobroma cacao). *Revista Tecnológica ESPOL*.

Ramírez, M., Romero, T., & Robles, V. (2021). *Fermentación de cacao Microorganismos esenciales para el desarrollo del aroma y sabor del chocolate.* (Editorial Ácademica Española, Ed.).

Ramirez, M., Romero, T., & Robles, V. (2021). *Fermentación del Cacao* (1st ed., Vol. 1). Editorial Académica Española.

Rivera Fernández, R. D., Barrera Álvarez, A. E., Guzmán Cedeño, Á. M., Medina Quinteros, H. N., Casanova Ferrín, L. M., Peña Galeas, M. M., & Nivela Morante, P. E. (2022). Efecto del tipo y tiempo de fermentación en la calidad física y química del Cacao(Theobroma cacao L.) Tipo nacional. *Ciencia y Tecnología*, *5*(1), 7–12. https://doi.org/10.18779/cyt.v5i1.120

Rivera, J. (2018). *Correlación de la porosidad con el grado de fermentación del grano de cacao peruano (Theobroma cacao L.)*. Consejo Nacional de Ciencia, Tecnología e Innovación Tecnológica CONCYTEC.

Rodríguez, C., Guzman, A., Lara, M., Castillo, E., & Brandao, P. (2021). Aislamiento e identificación de lactobacillus spp. (lactobacillaceae) resistentes a cd(ii) y as(iii) recuperados de fermento de cacao. *Acta Biológica Colombiana*, *26*(0120-548X).

Romero, F. (2019). *Evaluación nutricional de una bebida fermentada utilizando suero de queso y harina de quinua germinada*. Universidad Nacional "Santiago Antúnez de Mayolo."

Rueda, M. (2019). *Optimización de las condiciones de cultivo de lactobacillus casei ATCC 393 empleando suero de leche como fuente de carbono para la producción de lactasa*. Universidad de las Américas.

Sacoto, C., Alvarado, A., Farah, S., & Martillo, J. (2022). Caracterización morfológica del cacao (Theobroma Cacao L.) del cantón Naranjal-Ecuador. *RTE Revista Tecnológica ESPOL*, 81–97.

Silva. Ruben. (2020). *Desarrollo de vinagre de pulpa de mango kent, (mangefera indica l.)" empleando acetobacter nativo"* . Universidad Agraria de la Selva Tingo María.

Wacher, M. (2021). Microorganismos y chocolate . *Revista Digital Universitaria*, 3–9.

Yánez, V. (2020). *Análisis comparativo de la diversidad microbiana y la producción de compuestos bioquímicos de cacao (theobroma cacao l.) variedades nacional y trinitario CCN-51 durante la fermentación*. Universidad de las Américas.

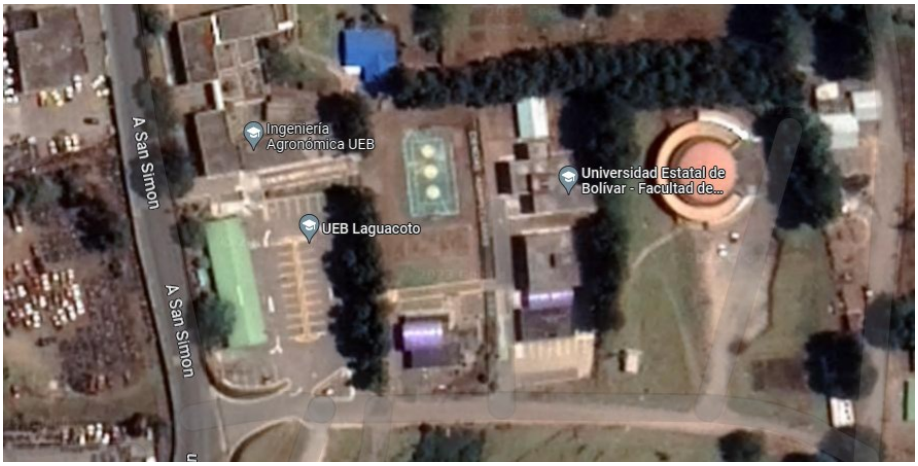
Zambrano, A., Romero, C., Gomez, A., Ramos, G., Lacruz, C., & Brunetto, M. (2010). Evaluación química de precursores de aroma y sabor del cacao criollo merideño durante la fermentación en dos condiciones edafoclimáticas. *Agronomía Tropical*, *60*.

Zhunio, B. (2020). *Evaluación de la actividad antioxidante en el mucílago de cacao (Theobroma cacao L.) Variedades: CCN-51 y Nacional*. Universidad Técnica Estatal de Quevedo.

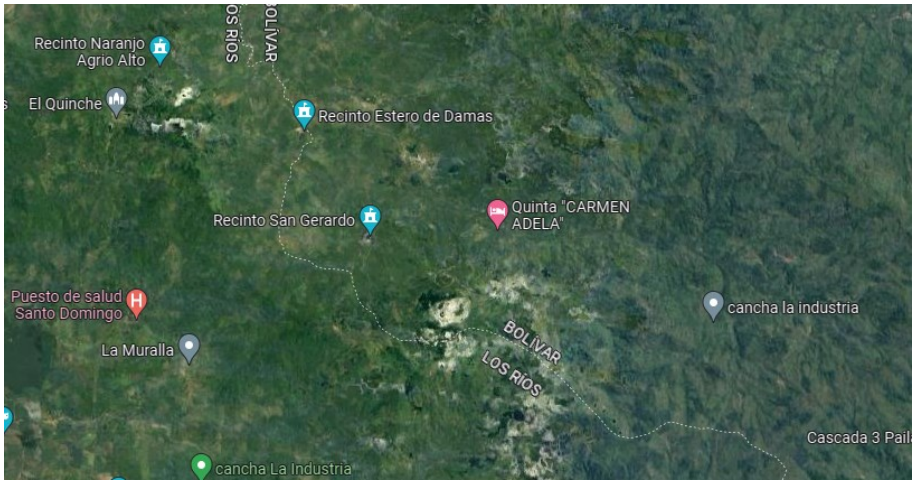
ANEXOS

Anexo 1

Ubicación de la investigación



Nota: Complejo agroindustrial Universidad Estatal de Bolívar



Nota: Recinto San Gerardo Cantón Echandía

Anexo 2

Presupuesto

Actividades	Tiempo – Meses					
	1	2	3	4	5	6
Designación de modalidad	X					
Elección del tema	X					
Compilación bibliográfica	X	X	X	X	X	
Presentación y aprobación del tema		X				
Defensa del anteproyecto		X				
Implementación del ensayo		X	X			
Manejo del ensayo	X	X	X	X	X	X
Registro de datos		X	X			
Visita de campo				X		
Toma de datos		X	X	X		
Análisis e interpretación				X		
Elaboración y presentación del borrador final				X		
Presentación del proyecto consolidado					X	

Componente	Unidad	Valor unitario	Valor total
Material de oficina	-	$ 20,00	$ 20,00
Materias primas	-	$ 200,00	$ 200,00
Aditivos	-	$ 200,00	$ 200,00
Cromatografías	3	$ 246,00	$ 738,00
Análisis de laboratorio	-	$ 100,00	$ 100,00
Transportes y alimentos	2	$ 150,00	$ 300,00
Empastados	-	$ 40,00	$ 40,00
Subtotal			$1598,00
Imprevistos (10%)			$ 160,00
Total			$ 1757,80

Anexo 3

Certificados análisis INIAP

INIAP	INSTITUTO NACIONAL DE INVESTIGACIONES AGROPECUARIAS ESTACIÓN EXPERIMENTAL SANTA CATALINA DEPARTAMENTO DE NUTRICIÓN Y CALIDAD LABORATORIO DE SERVICIO DE ANÁLISIS E INVESTIGACIÓN EN ALIMENTOS Panamericana Sur Km. 1. CutuglaguaTlfs. 2690691-3007134. Fax 3007134 Casilla postal 17-01-340	LSAIA/DNC/EESC	MC-LSAIA-2201 Rev. 9

INFORME DE ENSAYO N°: 0039

**NOMBRE DEL PETICIONARIO:	Sr. ISIDRO BAYAS	**INSTITUCIÓN:	PARTICULAR
**DIRECCIÓN:	GUARANDA/BOLIVAR	**ATENCIÓN:	Sr. ISIDRO BAYAS
FECHA DE EMISIÓN:	10/04/2024	FECHA DE RECEPCIÓN:	25/03/2024
FECHA DE ANÁLISIS:	Del 25 de marzo al 10 de abril del 2024	HORA DE RECEPCIÓN:	9H00
ANÁLISIS SOLICITADOS:	GRASA, TEOBROMINA, CAFEINA,POLIFENOLES		

RESULTADO DE ANÁLISIS

ANÁLISIS	**TIPO DE MUESTRA	CÓDIGO DE LA MUESTRA	MÉTODO INTERNO	METODO DE REFERENCIA	RESULTADO	UNIDAD
HUMEDAD	Pasta de Cacao M1	24-0174	MO-LSAIA-01.01	U. FLORIDA 1970	4,39	%
POLIFENOLES$^{\Omega}$	Pasta de Cacao M1	24-0174	MO-LSAIA-31	Cross, E. y Maringo, G. 1973/1982	75,33	mg Ac. Gálico/g
TEOBROMINA$^{\Omega}$	Pasta de Cacao M1	24-0174	MO-LSAIA-30	AOAC 980.14-1998	2,23	%
CAFEÍNA$^{\Omega}$	Pasta de Cacao M1	24-0174	MO-LSAIA-30	AOAC 980.14-1998	0,42	%
GRASA$^{\Omega}$	Pasta de Cacao M1	24-0174	MO.LSAIA-28	IOCC 37-1990	52,18	%
HUMEDAD	Pasta de Cacao M1 R1	24-0175	MO-LSAIA-01.01	U. FLORIDA 1970	1,73	%
POLIFENOLES$^{\Omega}$	Pasta de Cacao M1 R1	24-0175	MO-LSAIA-31	Cross, E. y Maringo, G. 1973/1982	69,90	mg Ac. Gálico/g
TEOBROMINA$^{\Omega}$	Pasta de Cacao M1 R1	24-0175	MO-LSAIA-30	AOAC 980.14-1998	2,06	%
CAFEÍNA$^{\Omega}$	Pasta de Cacao M1 R1	24-0175	MO-LSAIA-30	AOAC 980.14-1998	0,45	%
GRASA$^{\Omega}$	Pasta de Cacao M1 R1	24-0175	MO.LSAIA-28	IOCC 37-1990	52,55	%
HUMEDAD	Pasta de Cacao M2	24-0176	MO-LSAIA-01.01	U. FLORIDA 1970	3,28	%
POLIFENOLES$^{\Omega}$	Pasta de Cacao M2	24-0176	MO-LSAIA-31	Cross, E. y Maringo, G. 1973/1982	90,46	mg Ac. Gálico/g
TEOBROMINA$^{\Omega}$	Pasta de Cacao M2	24-0176	MO-LSAIA-30	AOAC 980.14-1998	1,57	%
CAFEÍNA$^{\Omega}$	Pasta de Cacao M2	24-0176	MO-LSAIA-30	AOAC 980.14-1998	0,27	%
GRASA$^{\Omega}$	Pasta de Cacao M2	24-0176	MO.LSAIA-28	IOCC 37-1990	56,28	%

ANÁLISIS	**TIPO DE MUESTRA	CÓDIGO DE LA MUESTRA	MÉTODO INTERNO	METODO DE REFERENCIA	RESULTADO	UNIDAD
HUMEDAD	Pasta de Cacao M2 R1	24-0177	MO-LSAIA-01.01	U. FLORIDA 1970	5,11	%
POLIFENOLES$^{\Omega}$	Pasta de Cacao M2 R1	24-0177	MO-LSAIA-31	Cross, E. y Maringo, G. 1973/1982	88,71	mg Ac. Gálico/g
TEOBROMINA$^{\Omega}$	Pasta de Cacao M2 R1	24-0177	MO-LSAIA-30	AOAC 980.14-1998	1,62	%
CAFEÍNA$^{\Omega}$	Pasta de Cacao M2 R1	24-0177	MO-LSAIA-30	AOAC 980.14-1998	0,26	%
GRASA$^{\Omega}$	Pasta de Cacao M2 R1	24-0177	MO.LSAIA-28	IOCC 37-1990	53,46	%
HUMEDAD	Pasta de Cacao M3	24-0178	MO-LSAIA-01.01	U. FLORIDA 1970	4,13	%
POLIFENOLES$^{\Omega}$	Pasta de Cacao M3	24-0178	MO-LSAIA-31	Cross, E. y Maringo, G. 1973/1982	80,86	mg Ac. Gálico/g
TEOBROMINA$^{\Omega}$	Pasta de Cacao M3	24-0178	MO-LSAIA-30	AOAC 980.14-1998	1,70	%
CAFEÍNA$^{\Omega}$	Pasta de Cacao M3	24-0178	MO-LSAIA-30	AOAC 980.14-1998	0,35	%
GRASA$^{\Omega}$	Pasta de Cacao M3	24-0178	MO.LSAIA-28	IOCC 37-1990	54,63	%
HUMEDAD	Pasta de Cacao M3 R1	24-0179	MO-LSAIA-01.01	U. FLORIDA 1970	4,42	%
POLIFENOLES$^{\Omega}$	Pasta de Cacao M3 R1	24-0179	MO-LSAIA-31	Cross, E. y Maringo, G. 1973/1982	79,78	mg Ac. Gálico/g
TEOBROMINA$^{\Omega}$	Pasta de Cacao M3 R1	24-0179	MO-LSAIA-30	AOAC 980.14-1998	1,75	%
CAFEÍNA$^{\Omega}$	Pasta de Cacao M3 R1	24-0179	MO-LSAIA-30	AOAC 980.14-1998	0,42	%
GRASA$^{\Omega}$	Pasta de Cacao M3 R1	24-0179	MO.LSAIA-28	IOCC 37-1990	53,36	%
HUMEDAD	Pasta de Cacao M4	24-0180	MO-LSAIA-01.01	U. FLORIDA 1970	3,62	%
POLIFENOLES$^{\Omega}$	Pasta de Cacao M4	24-0180	MO-LSAIA-31	Cross, E. y Maringo, G. 1973/1982	85,56	mg Ac. Gálico/g
TEOBROMINA$^{\Omega}$	Pasta de Cacao M4	24-0180	MO-LSAIA-30	AOAC 980.14-1998	1,57	%
CAFEÍNA$^{\Omega}$	Pasta de Cacao M4	24-0180	MO-LSAIA-30	AOAC 980.14-1998	0,23	%
GRASA$^{\Omega}$	Pasta de Cacao M4	24-0180	MO.LSAIA-28	IOCC 37-1990	53,55	%

ANÁLISIS	**TIPO DE MUESTRA	CÓDIGO DE LA MUESTRA	MÉTODO INTERNO	METODO DE REFERENCIA	RESULTADO	UNIDAD
HUMEDAD	Pasta de Cacao M4 R1	24-0181	MO-LSAIA-01.01	U. FLORIDA 1970	3,67	%
POLIFENOLES$^{\Omega}$	Pasta de Cacao M4 R1	24-0181	MO-LSAIA-31	Cross, E. y Maringo, G. 1973/1982	85,13	mg Ac. Gálico/g
TEOBROMINA$^{\Omega}$	Pasta de Cacao M4 R1	24-0181	MO-LSAIA-30	AOAC 980.14-1998	1,57	%
CAFEÍNA$^{\Omega}$	Pasta de Cacao M4 R1	24-0181	MO-LSAIA-30	AOAC 980.14-1998	0,28	%
GRASA$^{\Omega}$	Pasta de Cacao M4 R1	24-0181	MO.LSAIA-28	IOCC 37-1990	52,77	%
HUMEDAD	Pasta de Cacao M5	24-0182	MO-LSAIA-01.01	U. FLORIDA 1970	4,55	%
POLIFENOLES$^{\Omega}$	Pasta de Cacao M5	24-0182	MO-LSAIA-31	Cross, E. y Maringo, G. 1973/1982	82,93	mg Ac. Gálico/g
TEOBROMINA$^{\Omega}$	Pasta de Cacao M5	24-0182	MO-LSAIA-30	AOAC 980.14-1998	1,63	%
CAFEÍNA$^{\Omega}$	Pasta de Cacao M5	24-0182	MO-LSAIA-30	AOAC 980.14-1998	0,28	%
GRASA$^{\Omega}$	Pasta de Cacao M5	24-0182	MO.LSAIA-28	IOCC 37-1990	51,93	%
HUMEDAD	Pasta de Cacao M5 R1	24-0183	MO-LSAIA-01.01	U. FLORIDA 1970	3,33	%
POLIFENOLES$^{\Omega}$	Pasta de Cacao M5 R1	24-0183	MO-LSAIA-31	Cross, E. y Maringo, G. 1973/1982	77,86	mg Ac. Gálico/g
TEOBROMINA$^{\Omega}$	Pasta de Cacao M5 R1	24-0183	MO-LSAIA-30	AOAC 980.14-1998	1,68	%
CAFEÍNA$^{\Omega}$	Pasta de Cacao M5 R1	24-0183	MO-LSAIA-30	AOAC 980.14-1998	0,38	%
GRASA$^{\Omega}$	Pasta de Cacao M5 R1	24-0183	MO.LSAIA-28	IOCC 37-1990	51,82	%
HUMEDAD	Pasta de Cacao M6	24-0184	MO-LSAIA-01.01	U. FLORIDA 1970	4,45	%
POLIFENOLES$^{\Omega}$	Pasta de Cacao M6	24-0184	MO-LSAIA-31	Cross, E. y Maringo, G. 1973/1982	81,21	mg Ac. Gálico/g
TEOBROMINA$^{\Omega}$	Pasta de Cacao M6	24-0184	MO-LSAIA-30	AOAC 980.14-1998	1,62	%
CAFEÍNA$^{\Omega}$	Pasta de Cacao M6	24-0184	MO-LSAIA-30	AOAC 980.14-1998	0,27	%
GRASA$^{\Omega}$	Pasta de Cacao M6	24-0184	MO.LSAIA-28	IOCC 37-1990	51,84	%

ANÁLISIS	**TIPO DE MUESTRA	CÓDIGO DE LA MUESTRA	MÉTODO INTERNO	METODO DE REFERENCIA	RESULTADO	UNIDAD
HUMEDAD	Pasta de Cacao M6 R1	24-0185	MO-LSAIA-01.01	U. FLORIDA 1970	4,17	%
POLIFENOLES$^{\Omega}$	Pasta de Cacao M6 R1	24-0185	MO-LSAIA-31	Cross, E. y Maringo, G. 1973/1982	77,37	mg Ac. Gálico/g
TEOBROMINA$^{\Omega}$	Pasta de Cacao M6 R1	24-0185	MO-LSAIA-30	AOAC 980.14-1998	1,60	%
CAFEÍNA$^{\Omega}$	Pasta de Cacao M6 R1	24-0185	MO-LSAIA-30	AOAC 980.14-1998	0,23	%
GRASA$^{\Omega}$	Pasta de Cacao M6 R1	24-0185	MO.LSAIA-28	IOCC 37-1990	53,54	%

OBSERVACIONES: Muestra entregada por el cliente. La toma de muestra no es responsabilidad del laboratorio, le corresponde al cliente. Los ensayos marcados con (Ω) se reportan en base seca. Este documento no puede ser reproducido ni total ni parcialmente sin la aprobación escrita del laboratorio. Los resultados arriba indicados solo están relacionados con la muestra sometida a ensayo que se detalla en éste documento tal como se recibió. El laboratorio se responsabiliza de toda la información suministrada en el informe, excepto cuando la información la suministre el cliente.

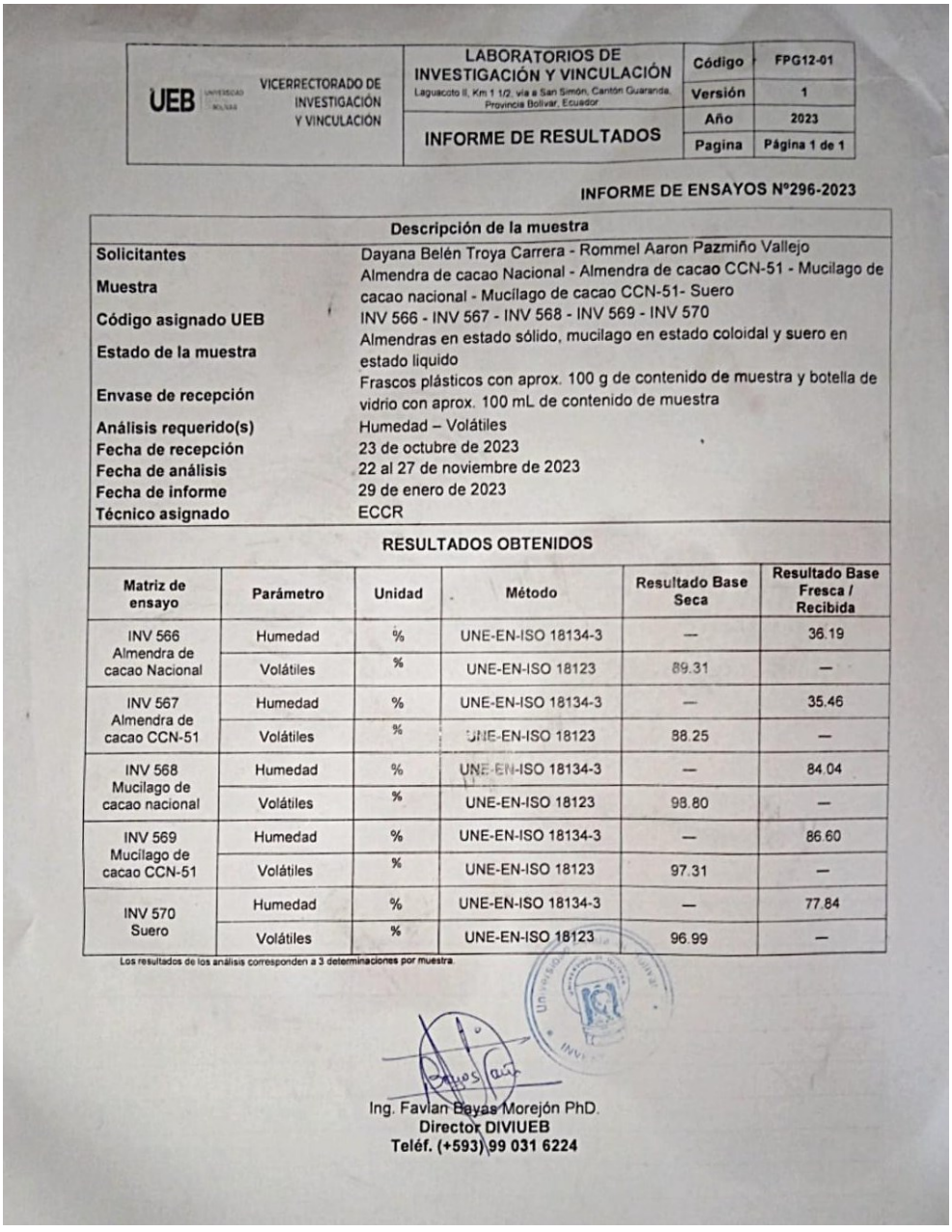
NOTA DE DESCARGO: Si el lector de este correo electrónico no es el destinatario del mismo, se le notifica que cualquier copia o distribución de este se encuentra totalmente prohibido. Si usted ha recibido este informe de ensayo por error, por favor notifique inmediatamente al remitente por este mismo medio y elimine la información. De igual manera, la información entregada por el cliente, generada durante las actividades del laboratorio e información contenida en éste informe es de carácter confidencial, está dirigida únicamente al destinatario de la misma y solo podrá ser usada por éste.

Los datos marcados con ** son suministrados por cliente, el laboratorio no se responsabiliza por esta información.

	RESPONSABLES DEL INFORME
Nombre	*Dr. Iván Samaniego. PhD.*
Cargo	*RESPONSABLE DNC*
Firma	 FIRMADO ELECTRÓNICAMENTE POR: IVAN RODRIGO SAMANIEGO MAIGUA
Fecha	*2024-04-10*

Anexo 4

Informe de resultados de humedad y volátiles análisis del Laboratorio de Investigación y Vinculación de la UEB



UEB UNIVERSIDAD ESTATAL BOLÍVAR	VICERRECTORADO DE INVESTIGACIÓN Y VINCULACIÓN	LABORATORIOS DE INVESTIGACIÓN Y VINCULACIÓN Laguacoto II, Km 1 1/2, vía a San Simón, Cantón Guaranda, Provincia Bolívar, Ecuador	Código	FPG12-01
			Versión	1
			Año	2023
		INFORME DE RESULTADOS	Pagina	Página 1 de 1

INFORME DE ENSAYOS N°296-2023

Descripción de la muestra	
Solicitantes	Dayana Belén Troya Carrera - Rommel Aaron Pazmiño Vallejo
Muestra	Almendra de cacao Nacional - Almendra de cacao CCN-51 - Mucilago de cacao nacional - Mucílago de cacao CCN-51- Suero
Código asignado UEB	INV 566 - INV 567 - INV 568 - INV 569 - INV 570
Estado de la muestra	Almendras en estado sólido, mucilago en estado coloidal y suero en estado liquido
Envase de recepción	Frascos plásticos con aprox. 100 g de contenido de muestra y botella de vidrio con aprox. 100 mL de contenido de muestra
Análisis requerido(s)	Humedad – Volátiles
Fecha de recepción	23 de octubre de 2023
Fecha de análisis	22 al 27 de noviembre de 2023
Fecha de informe	29 de enero de 2023
Técnico asignado	ECCR

RESULTADOS OBTENIDOS

Matriz de ensayo	Parámetro	Unidad	Método	Resultado Base Seca	Resultado Base Fresca / Recibida
INV 566 Almendra de cacao Nacional	Humedad	%	UNE-EN-ISO 18134-3	—	36.19
	Volátiles	%	UNE-EN-ISO 18123	89.31	—
INV 567 Almendra de cacao CCN-51	Humedad	%	UNE-EN-ISO 18134-3	—	35.46
	Volátiles	%	UNE-EN-ISO 18123	88.25	—
INV 568 Mucilago de cacao nacional	Humedad	%	UNE-EN-ISO 18134-3	—	84.04
	Volátiles	%	UNE-EN-ISO 18123	98.80	—
INV 569 Mucílago de cacao CCN-51	Humedad	%	UNE-EN-ISO 18134-3	—	86.60
	Volátiles	%	UNE-EN-ISO 18123	97.31	—
INV 570 Suero	Humedad	%	UNE-EN-ISO 18134-3	—	77.84
	Volátiles	%	UNE-EN-ISO 18123	96.99	—

Los resultados de los análisis corresponden a 3 determinaciones por muestra.

Ing. Favian Bayas Morejón PhD.
Director DIVIUEB
Teléf. (+593) 99 031 6224

Anexo 5

Análisis de proteína por parte del Laboratorio de Investigación y Vinculación de la UEB.

VICERRECTORADO DE INVESTIGACIÓN Y VINCULACIÓN	LABORATORIOS DE INVESTIGACIÓN Y VINCULACIÓN Laguacoto II, Km 1 1/2, vía a San Simón, Cantón Guaranda. Provincia Bolívar, Ecuador.	Código	FPG12-01
		Versión	1
		Ano	2024
	INFORME DE RESULTADOS	Pagina	Página 1 de 2

INFORME N° 009-2024

DESCRIPCIÓN DE LA MUESTRA	
Solicitante	Rommel Aaron Pazmiño Vallejo y Dayana Belén Troya Carrera
Muestra	Almendra de caco nacional, cacao CCN 51, mucílago de cacao nacional, mucílago de cacao CCN 51 y suero.
Código asignado UEB	INV- 566, INV- 567; INV- 568; INV – 569 ; INV- 570
Estado de la muestra	Sólido y líquido viscoso
Envase de recepción	Frascos de plástico
Análisis requerido(s)	Porcentaje de Proteína total
Fecha de recepción	23/10/2023
Fecha de análisis	27/10/2023
Fecha de informe	18-01-2024
Técnico (s) asignado	MIPV

RESULTADOS OBTENIDOS

Código de laboratorio	Muestra	Parámetros	Unidad	Método	Resultado	Promedio
INV- 566	Almendra de caco nacional, R1	Porcentaje de proteína	%	Dumas	11,66	11,62
	Almendra de caco nacional, R2				11,60	
	Almendra de caco nacional, R3				11,60	
INV- 567	Almendra de cacao CCN 51, R1	Porcentaje de proteína	%	Dumas	14,52	14,28
	Almendra de cacao CCN 51, R2				14,17	
	Almendra de cacao CCN 51, R3				14,17	
INV- 568	Mucílago de cacao nacional, R1	Porcentaje de proteína	%	Dumas	0,87	0,89
	Mucílago de cacao nacional, R2				0,93	
	Mucílago de cacao nacional, R3				0,87	
INV- 569	Mucílago de cacao CCN 51, R1	Porcentaje de proteína	%	Dumas	0,52	0,58
	Mucílago de cacao CCN 51, R2				0,58	
	Mucílago de cacao CCN 51, R3				0,64	

VICERRECTORADO DE INVESTIGACIÓN Y VINCULACIÓN	LABORATORIOS DE INVESTIGACIÓN Y VINCULACIÓN Laguacoto II, Km 1 1/2, vía a San Simón, Cantón Guaranda, Provincia Bolívar, Ecuador.	Código	FPG12-01
		Versión	1
	INFORME DE RESULTADOS	Año	2024
		Pagina	Página 2 de 2

INV- 570	Suero, R1	Porcentaje de proteína	%	Dumas	0,93	0,91
	Suero, R2				0,87	
	Suero, R3				0,93	

Los análisis se realizaron con tres réplicas

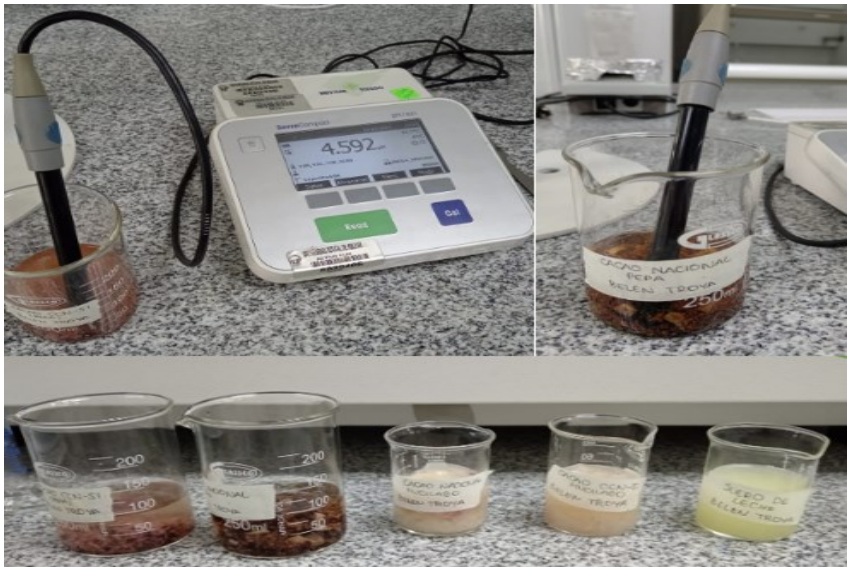
Dr. Pavian Bayas Morejón
Director DIVIUEB

Anexo 6

Anexos de imágenes



Nota: Cosecha cacao en el recinto San Gerardo



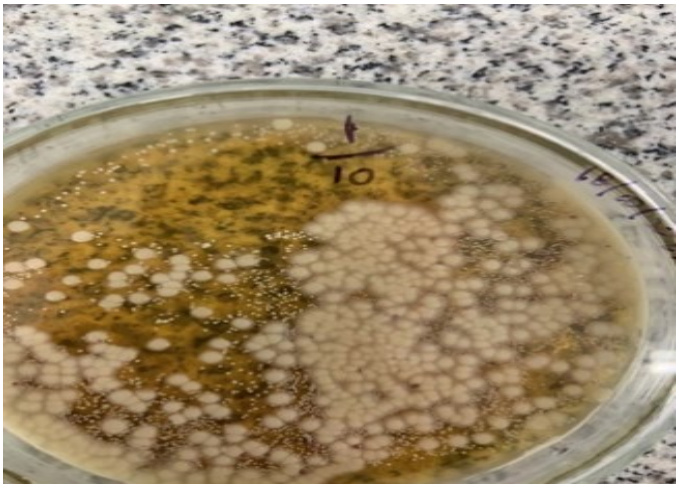
Nota: Caracterización materia prima



Nota: Análisis físico químico y proximal de la materia prima



Nota: Incubación sustrato.



Nota: Conteo bacterias



Nota: Incubación sustratos.



Nota: Secado cacao



Nota: Escalamiento fermentación cacao



Nota: Fabricación pasta de cacao

Anexo 7

Glosario de términos

- Fermentación: Proceso bioquímico en el cual los microorganismos presentes en la pulpa del cacao descomponen los azúcares y otros compuestos, generando cambios químicos y físicos en las semillas de cacao.
- Fermentación anaeróbica: Tipo de fermentación en el cual el proceso se lleva a cabo en ausencia de oxígeno.
- Fermentación aeróbica: Tipo de fermentación en el cual el proceso se lleva a cabo en presencia de oxígeno.
- Volatilidad: Cambios físicos y químicos que ocurren durante la fermentación, como la evaporación de compuestos volátiles que pueden afectar el perfil de sabor y aroma del cacao.
- pH: Medida de acidez o alcalinidad de una solución. Durante la fermentación, el pH de las semillas de cacao disminuye a medida que los microorganismos metabolizan los azúcares.
- Bacterias ácido-lácticas: Tipos específicos de bacterias que desempeñan un papel importante en la fermentación del cacao, produciendo ácido láctico y contribuyendo a la generación de sabores y aromas característicos.