



FACULTAD DE INGENIERÍA Y CIENCIAS AGROPECUARIAS

DISEÑO DE PROCESOS POSCOSECHA Y
EVALUACIÓN DE LA FERMENTACIÓN
MEDIANTE LEVADURAS PARA CACAO
NACIONAL.

AUTORES

Cristina Maribel Daza Safadi

Esteban Andrés Tapia Román

AÑO

2017



FACULTAD DE INGENIERIAS Y CIENCIAS AGROPECUARIAS

DISEÑO DE PROCESOS POSCOSECHA Y EVALUACIÓN DE LA
FERMENTACIÓN MEDIANTE LEVADURAS PARA CACAO NACIONAL.

“Trabajo de Titulación presentado en conformidad con los requisitos
establecidos para optar por el título de Ingenieros Agroindustriales y de
Alimentos”

Profesora Guía
M.Sc. María Raquel Meléndez Jácome

Autores
Cristina Maribel Daza Safadi
Esteban Andrés Tapia Román

Año
2017

DECLARACIÓN DEL PROFESOR GUÍA

“Declaro haber dirigido este trabajo a través de reuniones periódicas con los estudiantes, orientando sus conocimientos y competencias para un eficiente desarrollo del tema escogido y dando cumplimiento a todas las disposiciones vigentes que regulan los Trabajos de Titulación”

María Raquel Meléndez Jácome
Máster en Protección Vegetal y Fitofarmacia
C.I 1709384067

DECLARACIÓN DEL PROFESOR CORRECTOR

“Declaro haber revisado este trabajo, dando cumplimiento a todas las disposiciones vigentes que regulan los Trabajos de Titulación”

Pablo Vladimir Coba Santamaría

Máster en Etnobiofarmacia

C.I 1716475734

DECLARACIÓN DE AUTORÍA DEL ESTUDIANTE

“Declaramos que este trabajo es original, de nuestra autoría, que se han citado las fuentes correspondientes y que en su ejecución se respetaron las disposiciones legales que protegen los derechos de autor vigentes.”

Cristina Maribel Daza Safadi
C.I 1726738782

Esteban Andrés Tapia Román
C.I 1716112600

AGRADECIMIENTOS

Agradecemos a Dios por estar siempre presente en nuestras vidas, a nuestros padres por su amor, apoyo y cariño incondicional.

A nuestros respectivos hermanos por ser nuestros fieles compañeros.

A la Universidad de las Américas y al equipo de Docentes por haber impartido todo su conocimiento y sabiduría para nuestra formación profesional y personal.

DEDICATORIA

A mis amados padres Maribel y Rubén por su apoyo incondicional en cada etapa de mi vida.

A mi hermano Pedro por alegrar mis días.

A mis abuelos Anita y Antonio porque su amor y sus consejos hicieron de mí la persona que soy ahora.

Cristina Maribel Daza Safadi

DEDICATORIA

El presente trabajo es dedicado a mi familia, pues sus enseñanzas han forjado mi carácter y personalidad.

A todas aquellas personas que han estado presentes a lo largo de mi vida y han dejado rasgos de sus vivencias y conocimientos en mí.

Esteban Andrés Tapia Román.

RESÚMEN

El presente trabajo describe una propuesta de diseño para una planta de beneficio de Cacao Nacional para la empresa “La Leyenda del Chocolate LTDA.” ubicada en la Parroquia de Puerto Quito, Pichincha, Ecuador. Los procesos poscosecha de cacao en Ecuador son realizados de manera empírica por los agricultores, provocando una alta variabilidad en la calidad final de los granos. Con la finalidad de estandarizar la calidad de Cacao Nacional en la poscosecha de la planta de elaboración de chocolate, la empresa ha solicitado un diseño para la implementación de procesos poscosecha. Para el diseño de instalaciones se analizaron varias opciones y metodologías de fermentación y secado para determinar las alternativas que mejor se adapten a las condiciones de la empresa.

Adicionalmente, con el fin de estandarizar en mayor medida los procesos de fermentación de Cacao Nacional en Puerto Quito se realizó la identificación de las levaduras presentes en este proceso para posteriormente inocularlas y evaluar su comportamiento. Se evaluó la inoculación de dos tratamientos, uno con *Saccharomyces cerevisiae* aisladas de Cacao Nacional, otro con *Saccharomyces cerevisiae* comercial y un testigo sin ninguna inoculación.

De esta manera se pudo concluir que el diseño de la planta de beneficio está dimensionado para la producción semanal de 625 kg de cacao Nacional. Las levaduras aisladas de la pulpa de cacao en proceso de fermentación pertenecen a los géneros, *Saccharomyces*, *Kloeckera* y *Candida*. El tratamiento con la inoculación de levaduras *Saccharomyces cerevisiae* aisladas de Cacao Nacional generó un mejor Índice de fermentación que fue el resto de tratamientos.

Desafortunadamente, no se han realizado estudios sobre el aislamiento y la identificación de las especies de levaduras involucradas durante la fermentación del cacao en Puerto Quito, que permitan realizar comparaciones, sin embargo con este estudio se logró identificar las especies de levadura dominantes durante la fermentación de granos de Cacao Nacional en esta zona.

ABSTRACT

This project describes a post-harvest method design for Cacao Nacional at the company "La Leyenda del Chocolate Ltda." located in Puerto Quito, Pichincha, Ecuador. The post-harvest stages of cocoa in Ecuador are carried out empirically by farmers, causing high variability in beans final quality. In order to standardize the quality of Cacao Nacional beans on the chocolate manufacturing plant, the company requested a model to implement post-harvest handling. For the design of facilities, several options and fermentation and drying methodologies were analyzed to determine the alternative that fits best to company working conditions.

Additionally, to standardize the fermentation processes of Cacao Nacional beans in Puerto Quito, the yeasts in this process were identified and subsequently inoculated and evaluated. The inoculation of two treatments and one control were assessed. The first treatment consisted in *Saccharomyces cerevisiae* isolated from Cacao Nacional beans, the second was a commercial *Saccharomyces cerevisiae* and finally, a non-inoculated control was used.

It was possible to conclude that the design of the post-harvest method is dimensioned for a weekly production of 625 kg of Cacao Nacional. Yeasts isolated from the mucilaginous pulp of the cocoa beans in the stage of fermentation belonged to *Saccharomyces*, *Kloeckera* and *Candida* genera. The sample inoculated with *Saccharomyces cerevisiae* yeasts isolated from Cacao Nacional generated a better fermentation index than the other two treatments.

Unfortunately, had not been realized studies dealing with isolation and identification of yeast species involved during cocoa fermentation have been performed in Puerto Quito, which allow comparisons, however, with this study, it was possible to identify the dominant yeast species during the fermentations of beans of Cacao Nacional in this area.

ÍNDICE

1.	INTRODUCCIÓN	1
1.1.	OBJETIVOS.....	4
2.	MARCO TEÓRICO	4
2.1.	Historia de cultivo de cacao en Ecuador.....	4
2.2.	Descripción del Cacao Nacional.....	5
2.3.	Descripción botánica de <i>Theobroma cacao</i> L.	6
2.4.	Manejo poscosecha de frutos de cacao	8
2.5.	Métodos de fermentación de Cacao	10
2.6.	Proceso de secado de cacao	11
2.7.	Diversidad de levaduras presentes en el proceso de fermentación de Cacao	13
2.8.	Roles de las levaduras durante el proceso de fermentación.....	17
3.	METODOLOGÍA.....	19
3.1.	Materiales y Métodos	19
3.1.1.	Diseño del proceso de poscosecha de Cacao Nacional	19
3.1.2.	Estudio del proceso de fermentación mediado por levaduras	21
3.1.2.1.	Procedimiento de Muestreo de levaduras	21
3.1.2.2.	Determinación del tamaño de muestra	21
3.1.2.3.	Toma y preparación de muestras de granos de cacao	22
3.1.2.4.	Cuantificación de levaduras.....	23
3.1.2.5.	Aislamiento e identificación de levaduras	23
3.1.2.6.	Evaluación de la aplicación de levaduras comerciales y nativas	24
3.1.2.7.	Determinación del Índice de Fermentación	25
4.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	26
4.1.	Propuesta de diseño poscosecha para procesamiento de Cacao Nacional.....	26
4.1.1.	Requerimientos de materia prima.....	26

4.2.	Dimensionamiento de las instalaciones para los procesos poscosecha de cacao nacional.	27
4.2.1.	Instalaciones para el proceso de fermentación del grano de cacao.	27
4.2.2.	Instalaciones para el proceso de secado del grano de cacao.	29
4.2.3.	Diseño de la distribución planta de procesamiento de cacao poscosecha.	30
4.2.4.	Propuesta de estandarización de procedimientos operativos para Poscosecha de cacao Nacional	35
4.3.	Comportamiento de levaduras fermentadoras en Poscosecha.....	37
4.4.	Identificación bioquímica de levaduras nativas en granos de cacao en fermentación.....	39
4.5.	Porcentaje de presencia de levaduras de acuerdo al género en el proceso de fermentación de Cacao Nacional	42
4.6.	Análisis de pH y Temperatura de los tratamientos aplicados.....	44
4.7.	Índice de fermentación de los tratamientos aplicados.	47
5.	CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	51
5.1.	CONCLUSIONES.....	51
5.2.	RECOMENDACIONES	52
	REFERENCIAS	54
	ANEXOS.....	59

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Categorías de Calidad de Cacao.....	26
Figura 2. Cajas de fermentación en escalera.	27
Figura 3. Caja individual de fermentación.....	28
Figura 4. Caja de fermentación en escalera.	29
Figura 5. Marquesina de secado.	30
Figura 6. Diseño de distribución de la planta de poscosecha con dimensionamiento.....	32
Figura 7. Curva de pH y temperatura en función del tiempo medido en °C.	38
Figura 8. Porcentaje de levaduras durante las primeras 12 horas de fermentación.	43
Figura 9. Promedio de Temperaturas en cada uno de los tratamientos	44
Figura 10. Promedio de pH en cada uno de los tratamientos.	46
Figura 11. Porcentaje de granos marrones, violetas y pizarrosos durante la medición del Índice de fermentación.	48
Figura 12. Gráfica de probabilidad de RESID2	50

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Descripción taxonómica de la planta de cacao	6
Tabla 2. Levaduras aisladas en fermentación de cacao de cuatro países	14
Tabla 3. Nomenclatura de las levaduras	17
Tabla 4. Protocolo experimental para las cajas de fermentación.	25
Tabla 5. Cronograma de actividades poscosecha	36
Tabla 6. Características bioquímicas de las levaduras aisladas durante el proceso de fermentación.....	40
Tabla 7. Significado de las abreviaturas de los compuestos	41

1. INTRODUCCIÓN

El cacao ecuatoriano es apreciado por sus características organolépticas, lo cual genera una gran demanda a nivel mundial (Anecacao, 2015). Desde el año 2012, se ha registrado un crecimiento sostenido del 10% anual tanto en producción como en exportaciones de cacao (Moncayo, 2015). Al cierre del 2014, Ecuador se posicionó como el quinto productor mundial de cacao de aroma, exportando 235 mil toneladas métricas. Esto le permitió colocarse como productor luego de Nigeria, Indonesia, Ghana y Costa de Marfil, desplazando a Camerún y Brasil (Moncayo, 2015). En el año 2015 la producción de cacao abarcó alrededor de 260 mil toneladas métricas, generó 850 millones de dólares (Anecacao, 2015).

Según la Organización Internacional del Cacao (ICCO), el cacao de aroma ecuatoriano presenta diferentes calidades: Arriba Superior Summer Plantación Selecta (ASSPS), Arriba Superior Summer Selecto (ASSS), Arriba Superior Selecto (ASS), Arriba Superior Navidad (ASN), Arriba Superior Época (ASE)

Al finalizar el año 2015, el 47 % de las exportaciones de cacao correspondieron a la calidad de fino aroma A.S.E (Arriba Superior Época), el 30% a calidad CCN 51 (Colección Castro Naranjal), el 18% correspondió a la calidad fino aroma A.S.S. (Arriba Superior Selecto), y el 5% a la calidad fino aroma A.S.S.S (Arriba Superior Summer Selecto y 150 toneladas de A.S.N (Arriba Superior Navidad) fueron enviadas al exterior (Aprocafa, 2015).

De acuerdo al boletín anual del Banco Central del Ecuador, al finalizar el 2012 el cacao aparece como el cuarto producto de origen agrícola exportable, luego del banano, camarón y flores. Es importante recalcar que el 79% del cacao corresponde a grano seco y fermentado; y el 21% restante, forma parte de los semielaborados (licor, manteca, polvo, chocolate) (Banco Central del Ecuador, 2014).

La calidad del cacao, manifestada a través de sus características físicas y organolépticas, está determinada por factores edafoclimáticos del lugar de

plantación, el genotipo, las prácticas agronómicas realizadas y el manejo poscosecha del fruto (Reyes, 1999).

En Ecuador, los procesos poscosecha de cacao, fermentación y secado, han sido realizados empíricamente, sin procesos de estandarización al punto de generar una sanción en 1993, por parte de la Asociación Internacional de Cacao (ICCO). La sanción se dio por la baja calidad de los granos de cacao ecuatoriano. Esto representó una disminución del 25% al precio del cacao ecuatoriano en negocios internacionales (Bernal, 2007).

Ecuador produce un tipo de cacao mundialmente conocido como “Cacao Nacional”, el cual ingresa en la clasificación de Cacao Fino de Aroma. Este cacao se caracteriza por su corto proceso de fermentación y por sus características organolépticas superiores. (IICA, 2007).

Desde la época colonial hasta el año de 1910 el Cacao Nacional ecuatoriano era uniforme y sin defectos, no tenía rival en el mercado y todas las almendras tenían su característico sabor (INIAP, 2012). Sin embargo, en 1920, aparecieron dos enfermedades, Monilia y Escoba de bruja, las cuales afectaron gravemente la productividad de los cultivos de cacao.

En 1965, el agrónomo Homero Castro Zurita desarrolló el clon CCN-51, el cual tiene resistencia a las dos enfermedades antes mencionadas y, un índice de productividad superior (Anecacao, 2015). Este clon se cultivó rápidamente en fincas de pequeños y medianos productores, causando una drástica disminución del cultivo de Cacao Nacional en el país (INIAP, 2012).

A partir del año 2002 inició el proceso de la revalorización del Cacao Nacional; a través del proyecto llamado “Reactivación de la Producción y Mejora de la Calidad del Cacao Nacional”, a cargo del Ministerio de Agricultura, Ganadería, Acuacultura y Pesca (MAGAP). Este proyecto duró cinco años (IICA, 2007).

En Ecuador, según Rosero (2009) la fermentación del cacao es realizada de manera empírica, lo que genera granos de calidad variable. La empresa “La

Leyenda del chocolate LTDA.” compra Cacao Nacional a varios proveedores de la zona de Puerto Quito. Este proceso provoca que la materia prima tenga características distintas de acuerdo a la cosecha y por lo tanto, no se logra estandarizar el sabor final de sus productos procesados.

Durante la fermentación de la pulpa de cacao se desarrollan aromas y precursores del sabor del chocolate. Las enzimas producidas por varios microorganismos actúan fermentando la pulpa de la fruta y permiten el desarrollo de sabor y aroma. Esto genera una mejora en la calidad del cacao para ser procesado (Camu *et al.*, 2008). La sucesión microbiana en el proceso de fermentación se ha establecido claramente (Ostovar y Keeney, 1973). Las levaduras dominan el proceso de fermentación durante las primeras 24 horas. Posteriormente las bacterias ácido lácticas tienen mayor presencia hasta las 48 horas, en este punto las bacterias ácido acéticas encuentran las mejores condiciones para su desarrollo y están presentes en mayor cantidad hasta la culminación del proceso de fermentación (Ostovar y Keeney, 1973). Antiguamente no existían estudios sobre el rol de estos grupos microbianos, el proceso de fermentación, o su influencia sobre la calidad del grano de cacao y del chocolate (Roelofsen, 1958).

Sin embargo, en base a recientes investigaciones, las cuales involucran la inoculación de levaduras y bacterias, se llegó a la conclusión de que el crecimiento de levaduras es necesario para obtener una fermentación exitosa y la producción de granos de cacao con aromas y características típicas para la elaboración de chocolate (Ho, Zhao y Fleet, 2013).

Un estudio realizado en Australia en el año 2013, demostró que el crecimiento y la actividad de las levaduras son esenciales durante el proceso de fermentación ya que intervienen en el desarrollo de las características organolépticas de los granos de cacao (Ho, Zhao y Fleet, 2013). Debido a la falta de estandarización de las unidades productivas de cacao en Ecuador, en la Zona de Puerto Quito, es importante implementar mejoras en los procesos de poscosecha y en este trabajo se ha establecido como parte de los objetivos, el estudio del efecto de levaduras sobre el proceso de fermentación del grano de Cacao Nacional.

1.1. OBJETIVOS

Objetivo general:

Diseñar los procesos poscosecha para el manejo de Cacao Nacional en la empresa “La Leyenda del chocolate Cía. Ltda.”, mediante el establecimiento de procesos, esquematización de infraestructura, y el estudio de levaduras fermentadoras

Objetivos específicos:

- Diseñar la infraestructura y procedimientos para el proceso de fermentación y secado de Cacao Nacional.
 - Evaluar el efecto de levaduras comerciales y nativas sobre el proceso de fermentación de Cacao Nacional en la zona de Puerto Quito, mediante la evaluación de cualidades fisicoquímicas y sus efectos sobre el Índice de fermentación del grano de cacao

2. MARCO TEÓRICO

2.1. Historia de cultivo de cacao en Ecuador

El cultivo de cacao en Ecuador inició durante los años de la colonia (1532 - 1822), donde pobladores guayaquileños notaron los importantes réditos económicos del cultivo y a pesar de las prohibiciones de la corona española decidieron cultivar y comercializar granos de cacao. A pesar de varias quejas por parte del Cabildo de Caracas, principal productor regional de cacao, el “Rey Carlos IV” de España, aprobó el cultivo y exportación de cacao en 1789 desde las costas de lo que hoy se conoce como Ecuador. Esta es la razón por la cual existen registros oficiales de producción desde aquel año en adelante (Soria, s.f.).

Los primeros cultivos de cacao, en Ecuador, se establecieron a lo largo de los ríos Daule y Babahoyo en dirección hacia la cordillera. Esto promovió la denominación de “cacao arriba o variedad arriba” como era conocido el producto internamente (Soria, s.f.). El incremento en el área productiva y las exportaciones permitieron financiar la lucha por la independencia del Ecuador

(1800 - 1822), ya que el cacao representaba del 40 al 60 % de las exportaciones totales (Soria, s.f.).

Desde el año 1880 la producción de cacao se duplicó llegando a 15.000 T lo que representó para el país un gran crecimiento económico y una época de bonanza. En el año de 1890 Ecuador era el primer exportador de cacao en el mundo, pero esto cambió radicalmente durante los años 1920 con la aparición de enfermedades como la Monilia y la Escoba de la bruja que redujeron al 30% la capacidad de producción, que sumado a la primera guerra mundial dejaron al país en una crisis y recesión económica grave (Anecacao, 2015).

2.2. Descripción del Cacao Nacional

El cacao tipo Nacional tiene características muy apetecidas por fabricantes de chocolate al rededor del mundo. A inicios del siglo XIX, Ecuador exportaba únicamente cacao tipo Nacional, que internacionalmente era conocido como “cacao arriba” o “variedad arriba” (Enríquez, 2010). Cuando enfermedades como la Monilia y la Escoba de bruja atacaron los cultivos ecuatorianos y mermaron un gran porcentaje de su producción, la sustitución de cacaotales se aceleró con materiales genéticos importados desde Venezuela. Este cambio de material genético dio origen a la hoy predominante población de cacao tipo Nacional X Trinitario que mantenía gran parte de la calidad reconocida y una tolerancia a enfermedades (Quiroz, 1994).

Actualmente Ecuador es el primer productor mundial de cacao fino y de aroma, denominado Cacao Nacional. Existen más de 521.000 ha cultivadas en el territorio nacional (Vicepresidencia del Ecuador, 2015).

Sin embargo, cada vez más agricultores prefieren cambiar sus cultivos de Cacao Nacional por cacao CCN51 por su rendimiento superior y adaptabilidad a diferentes niveles de tecnología. A pesar de que el cacao fino y de aroma es más apetecido a nivel nacional por sus características organolépticas, esta variedad requiere procesos poscosecha y manejos agronómicos más especializados (Amores, 2009).

2.3. Descripción botánica de *Theobroma cacao* L.

En la tabla 1 se detalla la clasificación taxonómica de la planta de cacao.

Tabla 1.

Descripción taxonómica de la planta de cacao

Categoría	
Reino	Plantae
Subreino	Tracheobionta
División	Magnoliophyta
Clase	Magnoliopsida
Subclase	Magnoliopsida
Orden	Malvales
Familia	Malvaceae
Subfamilia	Byttneriosideae
Tribu	Theobromeae
Género	<i>Theobroma</i>
Especie	<i>Theobroma cacao</i> L.

Tomado de Batista, 2009

El árbol de cacao generalmente supera los 6 metros de altura, por su parte el árbol de Cacao Nacional del Ecuador y el Amelonado de África Occidental pueden alcanzar alturas de hasta 12 metros (Batista, 2009).

La raíz principal del cacao puede medir entre 1,20 metros y 1,50 metros de profundidad, en suelos bien aireados alcanza hasta 2 metros, mientras que su crecimiento se ve dificultado en suelos pedregosos. Finalmente, la raíz crece erecta o derecha en suelos con estructura granular uniforme y de textura arcillosa (Batista, 2009). Las plantas de cacao, propagadas por semillas, presentan un tallo principal que mide entre 1 y 2 metros de altura. Entre los 12 a 18 meses el crecimiento de la yema apical se hace imperceptible su crecimiento y de este nivel emergen de 3 a 5 ramas laterales conocidas como horqueta (Batista, 2009).

Las hojas de cacao presentan diferentes pigmentaciones, en los diferentes estados de crecimiento. Sin embargo, las hojas adultas son totalmente verdes. La forma de las hojas de la planta puede ser ligeramente lanceoladas, u ovaladas con una nervadura pinnada y superficies glabras, con nervio central prominente.

Las hojas se unen a las ramas o al tronco por medio de los peciolos de forma alterna. Los peciolos del tronco son más largos que aquellos insertos en las ramas (Batista, 2009).

El cacao tiene un tipo de polinización entomófila. La flor es hermafrodita, pentámera, de ovario súpero. La apertura del botón floral inicia en horas de la tarde por medio de un agrietamiento en su estructura y en horas de la mañana ya se encuentra totalmente abierta. Las anteras ricas en polen se abren y se mantienen viables desde la mañana por un período de dos días aproximadamente, siendo la única etapa disponible para la polinización (Batista, 2009). Una vez polinizadas las flores del cacao y fecundados los óvulos, se requieren de seis meses para que se desarrollen mazorcas fisiológicamente maduras. Las vainas que están dañadas o tengan infecciones fúngicas deben ser descartadas (Larrea, 2008). Apenas un 0,1% del total de flores de cacao, son fecundadas. Durante los primeros tres meses de desarrollo, las vainas pueden sufrir pasmazón por motivos nutricionales o fisiológicos o pueden verse afectadas por enfermedades en cualquier fase de crecimiento (Hardy, 1961). La madurez fisiológica de las mazorcas de cacao se aprecia por su cambio de color, el cual depende de la variedad (Enríquez, 1985). El cacao según la variedad tradicionalmente se clasifica en tres grupos genéticos: Criollo, Forastero y Trinitario (Dostert, Roque, Cano, La Torre y Wergeld, 2011). Los frutos de cacao Criollo tienen una pigmentación rojiza, el cacao Forastero se caracteriza por su fruto verde y el Cacao trinitario presenta frutos verdes o pigmentados (Dostert *et al.*, 2011). Una vez alcanzado el estado de madurez, el cacao de color verde pasa a amarillo y los rojos a anaranjado (Enríquez, 1985). Sin embargo, este cambio en la coloración del fruto puede no ser muy notorio y existe el riesgo de no cosechar a tiempo las mazorcas que han alcanzado su plena madurez. Por esto, los recolectores no se fían del color de las mazorcas sino únicamente del sonido que emiten cuando estas se golpean con el dedo (Enríquez, 1985).

Al cosechar las mazorcas del árbol de cacao, se debe evitar dañar las zonas leñosas donde se ubica el cojinete floral, ya que el cacao florece y fructifica preferentemente en las partes más viejas del mismo. Además, este daño puede

generar una vía abierta para la penetración de varias enfermedades como la Moniliasis, Escoba de bruja o Fitóptora (INIAP, 1999).

El árbol de cacao florece dos veces al año, el primer y más importante periodo de floración se da en los meses de junio y julio., y el segundo se da en los meses de septiembre y octubre. La maduración de los frutos de cacao tarda entre cuatro y seis meses, por lo que la cosecha del primer periodo se realiza en los meses de octubre, noviembre y diciembre, y la cosecha del segundo periodo se da durante marzo y abril (Batista, 2009). Se recomienda cosechar máximo cada 15 días en época lluviosa y cada 30 días en época seca para obtener una uniformidad en la fermentación (INIAP, 1999).

Como se mencionó anteriormente, el cacao se divide genéticamente en 3 grandes grupos: los Criollos, los Forasteros y los Trinitarios (Dostert *et al.*, 2011). Sin embargo, en Ecuador existe un tipo de cacao único en el mundo conocido con el nombre de “Cacao Nacional” o “Cacao Fino de Aroma” como es internacionalmente reconocido (IICA, 2007). Por mucho tiempo el Cacao Nacional se ha clasificado como un tipo de cacao Forastero, especialmente por las características de su mazorca. Varios estudios realizados recientemente, tanto en morfología, sabor como en ADN han demostrado que el Cacao Nacional presenta diferencias genéticas con los demás tipos de cacao. (Enríquez, 2004). Actualmente en el país la mayor parte de Cacao Nacional sembrado, pertenecen al genotipo Nacional x Forastero en su mayoría, seguido por el genotipo de Nacional x Trinitario (Enríquez, 2007). Se estima que quedan solamente unas 25 a 30.000 ha de Cacao Nacional puro, es decir, un 5 % del total del Cacao Nacional cultivado en el país (Enríquez, 2007).

2.4. Manejo poscosecha de frutos de cacao

Posterior a la cosecha de las mazorcas de cacao, existen 3 procedimientos fundamentales para obtener el beneficio de los frutos. La extracción del contenido de las mazorcas de cacao, la fermentación de los granos de cacao y el secado de los mismos (Malespín, 1982).

La apertura de la mazorca y la extracción del grano, debe llevarse a cabo en el mismo lugar de plantación, debido a que las cáscaras constituyen una fuente de minerales y materia orgánica para el suelo y refugio natural para los insectos polinizadores (INIAP, 1999). Los granos se deben extraer de la mazorca realizando un corte transversal en la cáscara con un machete, evitando lastimar el contenido. Los granos de color negro, planos o que no han crecido adecuadamente, deben ser separados y descartados (AusAID, 1998).

La fermentación de los granos de cacao es uno de los procesos poscosecha que tiene gran influencia sobre la calidad del producto final (Lagunés- Gálvez, Loiseau, Paredes, Barel y Guiraud, 2006). Este proceso se divide, según la reacción que predomine, en dos etapas: fermentación alcohólica y oxidación (Schwan y Wheals, 2004). En cada una de estas etapas se desencadenan una serie de cambios fisicoquímicos en los granos, que contribuyen a la reducción del amargor, astringencia y permiten la formación de precursores de aroma (Gálvez *et al.*, 2006).

En la primera etapa de fermentación, varios géneros de levaduras se encargan de consumir la gran cantidad de pulpa. Aproximadamente estos microorganismos consumen el 40% del peso total, que rodea a los granos de cacao frescos y producen metabolitos indispensables para iniciar el proceso de fermentación (Camú *et al.*, 2008). La pulpa o mucílago de cacao está compuesta por 82 a 87% de humedad, 10 a 15% de azúcar, 2 a 3% de pentosanos, 1 a 3% de ácido cítrico y 1 - 1,5% de pectina (Schwan y Wheals, 2004). El consumo de este mucílago, por parte de las levaduras, produce etanol y dióxido de carbono. Esta reacción, moderadamente exotérmica, es conocida como fermentación alcohólica y genera 93,3 kJ por molécula de glucosa consumida, provocando un aumento de temperatura significativo de 28 a 32°C en los granos de cacao (Jespersen, Nielsen y Jacobsen, 2005).

2.5. Métodos de fermentación de Cacao

Según Enríquez (1985), existen 6 métodos de fermentación clasificados de acuerdo a la infraestructura e insumos necesarios:

- La fermentación en montones requiere acumular granos de cacao sobre superficies porosas para permitir el escurrimiento. Se puede amontonar desde los 10,00 hasta los 2.000,00 kg de cacao y se debe tapar el material con hojas de plantas de la familia Musaceae, más conocidas como platanillos en las localidades productoras de cacao. Cada 24 horas se debe realizar una remoción de los granos para permitir el ingreso de aire al proceso de fermentación y permitir que los microorganismos entren en contacto con todo el material vegetal. La duración del proceso de fermentación, por este método, depende del tipo de cacao, de la variedad y de la zona de origen (Enríquez, 1985).
- El tiempo de fermentación del Cacao tipo Nacional o sus híbridos, es de cuatro a cinco días, los cacaos Trinitarios fermentan bien en cinco días y el cacao CCN - 51 requiere de cinco a seis días de fermentación siempre y cuando no se realice el presecado (Andrade, 2009).
- La fermentación en sacos se realiza llenando sacos de plástico o yute durante la cosecha con granos de cacao, para posteriormente trasladarlos a la zona de fermentación. Este proceso dura de 4 a 6 días. Se recomienda colgar los sacos para permitir una mayor aireación y cambiarlos cada dos días para provocar una remoción de la masa (Enríquez, 1985).
- Para fermentar pequeñas cantidades de cacao se recomienda el uso de canastos, los cuales son contruidos en base a materiales leñosos (Enríquez, 1985). Estos canastos tienen una profundidad de 10 cm y poseen una capacidad máxima de 140 kg. Los canastos permiten un escurrimiento del material líquido del mucílago y una buena aireación para la fermentación (Enríquez, 1985). Sin embargo, se deben realizar remociones del material vegetal cada 24 horas para mejorar al proceso. Una ventaja de este método es la posibilidad de secar los granos de cacao

en los mismos canastos, siempre que se disminuya la capa de cacao a 5 cm de espesor.

- La fermentación en cajas o cajones necesita de la elaboración de cajas de madera dura de 90 a 120 cm de ancho y 90 cm de altura con un fondo que permita el escurrimiento del cacao (Enríquez, 1985). Estas cajas deben estar colocadas dentro de una estructura con techo y que no permita fuertes corrientes de aire. Se debe remover la masa de cacao o cambiarla a diferentes cajas de fermentación durante las primeras 24, 48 y 72 horas para asegurar la aireación y el contacto de los microorganismos con todos los granos (Enríquez, 1985). Existe un método similar a las cajas de fermentación, donde las dimensiones de las cajas son disminuidas. Este método es utilizado por pequeños productores y sigue los mismos principios del método de cajas descrito (Enríquez, 1985).
- Para la fermentación por tambores giratorios se construyen barriles de madera adicionados de un sistema de mezclado accionado por palancas. El beneficio de este método es que asegura una buena aireación a toda la masa en fermentación y evita la pérdida de temperatura por volteos manuales (Enríquez, 1985).
- El último método de fermentación se denomina Rohan y se construyen bandejas de 120 cm de largo, 80 cm de ancho y 10 cm de profundidad. Estos recipientes deben tener perforaciones en la base para permitir el escurrimiento. Al momento de la fermentación se debe procurar no apilar más de 12 bandejas y cambiar su posición durante los primeros 3 días. La ventaja de este sistema es que no requiere la remoción del cacao.

2.6. Proceso de secado de cacao

Los granos de cacao recién fermentados presentan un contenido de humedad entre 55 y 60%, por esta razón luego de la fermentación, los granos se secan inmediatamente para reducir el contenido de humedad hasta un 7 a 8%. De esta

manera se reducen las pérdidas de masa y se evita el deterioro por moho y sobre todo se facilita la conservación del grano (Irie, Zahouli, Tagro, Monke, Ban-Koffi y Gnopo Nemli, 2010).

El secado se puede realizar utilizando corrientes de aire artificiales o naturales en dependencia de la cantidad de granos de cacao y las condiciones climáticas (Irie *et al.*, 2010). El método de secado solar implica la difusión del grano de cacao en tendales de caña, madera, cemento u hormigón (Irie *et al.*, 2010). Este último es el método más usado por los productores debido a que permite el manejo de cantidades pequeñas, es simple y económico. Sin embargo, entre las desventajas de este método destacan la labor que requiere, el tiempo que tarda el proceso de 5 a 7 días, las grandes superficies que se necesitan para secar los granos y, sobre todo, su dependencia de las condiciones climáticas. Efectivamente en periodo de lluvias durante el proceso de secado los granos se podrían ver afectados por el desarrollo de mohos debido a la ausencia de sol y la alta humedad (Jinap, Thien y Yap, 1994).

En zonas donde las condiciones climáticas no son las adecuadas, se recomienda el uso del secado artificial. Este tipo de secado requiere de un motor, ventilador o sistema de calefacción ya que, al añadirse calor al aire de secado, la velocidad de secado se acelera (Jayas y Sohkansanj, 1989). Es importante mencionar que las condiciones obtenidas con el secado artificial no son las mismas proporcionadas por el secado natural. El secado artificial evita que los procesos químicos que empezaron durante la fermentación puedan ser completados en su totalidad, por lo que únicamente garantiza un secado acelerado de los granos (Irie *et al.*, 2010).

Un estudio realizado en el Centro Nacional para la Investigación Agronómica (CNRA) en Costa de Marfil en el que se midió el efecto de los métodos de secado sobre los rasgos de calidad química de la materia prima de cacao demostraron que los métodos de secado determinan la calidad química del cacao. En efecto los granos de cacao secados al sol fueron globalmente menos ácidos que los granos de cacao secados artificialmente en un horno con aire caliente a 60°C y secado mixto (Irie *et al.*, 2010). Con respecto a la formación de nitrógeno amoniacal, los métodos de secado al horno y los métodos de secado mixto

produjeron mayor contenido de nitrógeno amoniacal en los granos de cacao que el método de secado natural (Irie *et al.*, 2010). Sin embargo, estos estudios también demostraron que los métodos de secado no tienen ningún efecto sobre la producción de ácidos grasos libres en el cacao (Irie *et al.*, 2010).

2.7. Diversidad de levaduras presentes en el proceso de fermentación de Cacao

Se han aislado diferentes especies de levaduras de fermentaciones de cacao en diversos estudios, pero sólo cuatro estudios han identificado simultáneamente levaduras y bacterias en diferentes países, como se muestra en la Tabla 2.

Tabla 2.

Levaduras aisladas en fermentación de cacao de cuatro países

Brasil	Ghana	Malasia	Belice
<i>Candida bombi</i>	<i>Candida spp.</i>	<i>Candida spp.</i>	<i>Brettanomyces clausenii.</i>
<i>Candida pelliculosa,</i>	<i>Hansenula spp.</i>	<i>Debaryomyces spp.</i>	<i>Candida spp.</i>
<i>Candida rugopelliculosa</i> <i>Candida rugosa,</i>	<i>Kloeckera spp.</i>	<i>Hanseniaspora spp.</i>	<i>Candida boindinii</i> <i>Candida cacaoi</i> <i>Candida guilliermondii</i>
<i>Kloeckera apiculata,</i>	<i>Pichia spp.</i>	<i>Hansenula spp.</i>	<i>Candida intermedia</i>
<i>Kluyveromyces marxianus</i>	<i>Saccharomyces spp.</i>	<i>Kloeckera spp.</i>	<i>Candida krusei</i>
<i>Kluyveromyces thermotolerans,</i>		<i>Rhodotorula spp.</i>	<i>Candida reukaufii,</i>
<i>Lodderomyces elongisporus,</i>		<i>Saccharomyces spp.</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae,</i>
<i>Pichia fermentans,</i>	<i>Saccharomyces spp.</i>		<i>Saccharomyces chevalieri,</i>
<i>Saccharomyces cerevisiae var. Chevalieri,</i>			<i>Kloeckera apis,</i>
			<i>Pichia membranaefaciens,</i>
<i>Saccharomyces cerevisiae,</i>	<i>Schizosaccharomyces spp.</i>	<i>Torulopsis spp.</i>	<i>Saccharomyces spp.</i>
<i>Torulopsis pretoriensis.</i>	<i>Torulopsis spp.</i>		<i>Schizosaccharomyces malidevorans</i>
			<i>Schizosaccharomyces spp.</i>

Tomado de Schwan y Wheals, 2004.

Otros estudios han identificado los géneros *Candida*, *Pichia*, *Saccharomyces*, *Kloeckera*, *Trichosporon*, y *Schizosaccharomyces* en Java (Roelofsen, 1958). *Kloeckera apis*, *Candida pelliculosa*, *Candida tropicalis*, y *Saccharomyces cerevisiae* en Indonesia (Ardhana,1990). *Pichia membranaefaciens*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida zeylanoides*, *Torulopsis candida*, *Torulopsis*

castelli, y *Torulopsis holmii* en Costa de Marfil (Gauthier, Guiraud, Vincent, Porvais Y Galzy, 1977).

En ninguno de los estudios antes mencionados se ha podido determinar si los diferentes géneros identificados en cada país se debieron a las prácticas de fermentación empleadas o a la geografía (Schwan Y Wheals, 2004).

En uno de los estudios más completos en fermentación de cacao realizado en 1995, por Schwan, Rose y Board, *Saccharomyces cerevisiae* fue la levadura dominante en los granos de cacao tomados de las cajas inmediatamente después del llenado de estas. *Kloeckera apiculata* creció durante la fase temprana de la fermentación, pero disminuyó rápidamente, de modo que no pudo aislarse después de 24 horas de fermentación. Esto refleja su intolerancia al etanol en concentraciones superiores al 4% (v / v) (Schwan, Rose, y Board, 1995).

En el trabajo de Schwan, Rose y Board *Kluyveromyces marxianus* es una levadura que crece lentamente al inicio de la fermentación y luego disminuye gradualmente. Dos cepas diferentes de *Saccharomyces cerevisiae* dominaron la fase de fermentación alcohólica y sobrevivieron a lo largo del proceso de fermentación. Se aislaron un pequeño número de *Pichia fermentans* y *Lodderomyces ellongisporus* pero sólo durante las primeras horas de fermentación (Schwan, Rose, y Board, 1995). *Candida spp.* aumentó en números después de 24 horas, *Candida rugosa* estuvo presente hasta el final de la fermentación cuando la temperatura fue de aproximadamente 50°C. Finalmente *Torulospira pretoriensis* y *Kluyveromyces thermotolerans* también se encontraron cuando la temperatura de la masa de fermentación fue de aproximadamente 50°C. Como se puede ver en la lista antes descrita la variedad de levaduras fue abundante debido a la composición de la pulpa de cacao que contiene, en promedio, 14% de azúcares, de éstos, el 60% es sacarosa y el 39% una mezcla de glucosa y fructosa (Pettipher, 1986). Todos estos azúcares son fermentados por las especies de levaduras mencionadas. Aun así, *Saccharomyces cerevisiae* fue la especie de levadura más comúnmente identificada en el estudio probablemente debido a su rápido crecimiento y tolerancia al etanol.

En un estudio realizado por Ostovar y Kenney, 1973 en Trinidad también se encontró *Saccharomyces cerevisiae* en números altos durante las primeras 24 horas de fermentación de cacao. Mientras que *Kluyveromyces marxianus*, *Kluyveromyces thermotolerans*, *Candida spp* y *Torulospira pretoriensis*, que estuvieron presentes en un número considerable en el estudio realizado por Schwan, Rose y Board, no se han reportado en fermentaciones de cacao en otros países (Lehrman y Patterson, 1984).

En el año 2006 Lagunes Gálvez, Lisia, Paredes, Barel y Guiraud realizaron una investigación en la que se estudiaron los parámetros de la fermentación del cacao en República Dominicana, a fin de determinar con mayor eficacia el papel de los microorganismos y su funcionamiento. En este trabajo, se identificaron 43 cepas de levaduras existentes durante la fermentación de cacao. Según pruebas API y pruebas bioquímicas complementarias, las 43 cepas de levadura aisladas pertenecían a los géneros *Candida*, *Hanseniaspora*, *Pichia* y *Yarrowia*.

La especie *Candida inconspicua* se caracteriza por persistir a lo largo de la fermentación, no produce etanol y no tiene ninguna actividad pectinolítica; sin embargo, es capaz de asimilar el ácido láctico (Lagunes- Gálvez, 2006).

La especie *Hanseniaspora guilliermondii* produce etanol, tiene actividad pectinolítica y está presente durante las primeras 36 horas de fermentación (Lagunes- Gálvez, 2006).

Las especies *Pichia fermentans*, *Yarrowia lipolytica* y *Candida zeylanoides* son capaces de oxidar el ácido cítrico y sólo la especie *Candida zeylanoides* no es capaz de producir etanol (Lagunes- Gálvez, 2006).

Las especies *Candida glabrata*, *Candida krusei* y *Hanseniaspora valbyensis* producen etanol y únicamente *Candida glabrata* es incapaz de oxidar los ácidos cítrico y láctico (Lagunes- Gálvez, 2006).

La mayoría de los géneros de levaduras aisladas durante este estudio ya se han observado en estudios anteriores de fermentación de cacao; por Ostovar y Kenney (1973) en Trinidad, por Carr, Davies y Dougan (1979) en Ghana y Malasia, por Ardhanan y Fleet (2003) en Malasia, por Ravelomanana (1985) en Madagascar y Costa de Marfil, por Cascante, Enríquez y García (1994) en

Ecuador, por Schwan Y Wheals (2004) en Brasil, por Jespersen, Nielsen y Jakobsen (2005) en el Oeste de África y Nielsen, Honholt, Tano-Debrah y Jespersen (2005) en Ghana.

Las levaduras son los únicos microorganismos vivos, que pueden tener dos nombres taxonómicamente válidos. El nombre principal está basado en el estado sexual o teleomórfica, mientras el segundo nombre válido puede basarse en el estado asexual o anamórfico. Actualmente el Código de Viena (2006) establece que las especies anamórficas que son miembros de una rama teleomórfica deben ser renombradas con el nombre del género teleomórfico, con la finalidad de obtener un único nombre de las especies de levaduras (Kurtzman, Fell y Boekhout, 2011), como se muestra a continuación en la Tabla 2.

Tabla 3.

Nomenclatura de las levaduras

Nomenclatura Anamórfica	Nomenclatura Telemórfica
<i>Candida krusei</i>	<i>Issatchenkia orientails</i>
<i>Candida norvegensis</i>	<i>Pichia norvegensis</i>
<i>Candida pelliculosa</i>	<i>Pichia anómala</i>
<i>Candida glabrata</i>	<i>Torulopsis glabrata</i>
<i>Candida famata</i>	<i>Pichia hansenii</i>
<i>Candida utilis</i>	<i>Pichia jadinii</i>
<i>Kloeckera apiculata</i>	<i>Hanseniaspora uvarum</i>
<i>Kloeckera apis</i>	<i>Hanseniaspora guillermondi</i>
<i>Kloeckera japónica</i>	<i>Hanseniaspora valbyensis</i>
<i>Saccharomyces chevalieri</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>

Adaptado de Schwan y Wheals, 2004.

2.8. Roles de las levaduras durante el proceso de fermentación

La pulpa ácida rica en azúcar proporciona condiciones ideales para el crecimiento rápido de la levadura. La conversión de sacarosa, glucosa y fructosa en etanol y CO₂ es la principal actividad de las levaduras fermentativas (Forsyth y Quesnel, 1963). También producen ácidos orgánicos incluyendo ácidos acético, oxálico, fosfórico, succínico y málico (Schwan y Wheals, 2004). Estos

ácidos orgánicos débiles tienen una capacidad tampón y tienden a reducir las variaciones en el pH (Forsyth y Quesnel, 1963).

Algunas de las levaduras, incluyendo *Candida spp.* y *Pichia spp.*, metabolizan el ácido cítrico haciendo que el valor del pH aumente en la pulpa, favoreciendo el crecimiento de bacterias. La reducción de ácido cítrico, junto con los niveles crecientes de alcohol y el aumento de aireación, inhiben el desarrollo de las levaduras y su actividad disminuye (Schwan y Wheals, 2004).

Además, estos microorganismos producen una serie de compuestos aromáticos, principalmente alcoholes de fusel, ácidos grasos y ésteres de ácidos grasos (Suomalainen Y Lehtonen, 1979). Los compuestos aromáticos son importantes en el desarrollo del sabor de chocolate (López, 1974).

Las cinco principales levaduras que producen estos compuestos volátiles son (*Kloeckera apiculata*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces cerevisiae* var. *Chevalieri*, *Candida spp.*, y *Kluyveromyces marxianus*) (Mateo, Jiménez, Huerta y pastor, 1991). *Kloeckera apiculata* y *Saccharomyces cerevisiae* var. *Chevalieri* son las principales productoras de compuestos volátiles tales como acetato de isopropilo, acetato de etilo, metanol, 1-propanol, alcohol isoamílico, 2,3 butanodiol, succinato de dietilo y 2-feniletanol (Schwan Y Wheals, 2004).

En Australia en el año 2013 se realizó un estudio la finalidad de determinar el papel de las levaduras en la fermentación del cacao y su contribución a la calidad del chocolate (Ho, Zhao y Fleet, 2013).

En este estudio se utilizaron dos cajas de fermentación, en una de ellas se roció una solución de 200 ppm de Natamicina sobre los granos de cacao para inhibir el crecimiento de las levaduras, mientras los granos de cacao en la otra caja no se trataron con Natamicina pero se mezclaron de forma similar. El proceso de fermentación tuvo una duración de seis días y una vez finalizado, se comparó la ecología y el metabolismo microbiano resultante, la química del grano y la calidad del chocolate en ambos tratamientos (Ho, Zhao y Fleet, 2013).

Los análisis físicos y químicos demostraron que los granos fermentados sin levaduras tenían un mayor contenido de cáscara, lo que sugiere que la pulpa no se había degradado completamente y permanecía unida a la testa, menor

producción de etanol, alcoholes y ésteres superiores a lo largo de la fermentación y menor presencia de pirazinas en el producto tostado (Ho, Zhao Y Fleet, 2013). Mientras los ensayos de calidad revelaron que los granos fermentados sin levaduras eran de color púrpura violáceo y no de color marrón, además el chocolate preparado a partir de estos granos fue más ácido y carecía de sabor característico de chocolate (Ho, Zhao Y Fleet, 2013).

Sin embargo, los granos fermentados con levaduras eran de color totalmente marrón y producían chocolate con caracteres típicos que eran claramente preferidos por los paneles sensoriales. Estos hallazgos demuestran que el crecimiento y la actividad de las levaduras son esenciales para la fermentación del grano de cacao y el desarrollo de características del chocolate (Ho, Zhao Y Fleet, 2013).

3. METODOLOGÍA

3.1. Materiales y Métodos

3.1.1. Diseño del proceso de poscosecha de Cacao Nacional

El proyecto de aislamiento e identificación de levaduras presentes en Cacao Nacional se realizó en el Cantón Puerto Quito ubicado al noroccidente de la provincia de Pichincha. Se caracteriza por tener precipitaciones que oscilan entre 1.000 a 2.000 mm anuales, la temperatura promedio anual es de 25°C, y la humedad relativa (HR) promedio varia alrededor de 86% (Gobierno de la provincia de Pichincha, 2012). Esta zona forma parte de la cuenca hidrográfica denominada Esmeraldas localizada en medio de las estribaciones del Volcán Pichincha y el inicio de la llanura costera, lo que le concede una gran biodiversidad de fauna y flora (Gobierno de la provincia de Pichincha, 2012). La toma de muestras de Cacao Nacional se realizó en el centro de acopio “Asociación Agropecuaria Nueva Esperanza” ubicado en el Cantón Puerto Quito. Para el proceso de fermentación la asociación utilizó una caja de madera de

laurel de medidas de $1 \times 1 \text{ m}^2$, ubicada por sobre los 10 cm del suelo y con perforaciones en la base de 5 mm entre las tablas. Esta disposición se realizó con el fin de evacuar la miel emanante del cacao lo más rápido posible. La caja de fermentación se llenó con 269,88 kg de masa de Cacao Nacional y se cubrió con hojas de banano y sacos de yute. La toma de muestras de los granos se efectuó a las 24 horas de iniciado el proceso de fermentación.

Parte del estudio de aislamiento e identificación de levaduras en Cacao Nacional incluye el diseño del proceso poscosecha para la empresa “La Leyenda del chocolate Cía. Ltda., con la ayuda de uno de los principales proveedores de la empresa, la Asociación “Nueva Esperanza”. Para esto se analizaron los requerimientos de materia prima que la empresa “La Leyenda del chocolate Cía. Ltda.” ha solicitado en base a las compras de cacao seco en el último año.

Se detallaron luego las características del espacio designado, por la empresa, para el diseño de los procesos poscosecha de Cacao Nacional. Posteriormente, se estudiaron los diferentes métodos de fermentación y secado disponibles, analizando las posibles ventajas y desventajas de cada método.

Una vez que se seleccionó el método más adecuado para los procesos antes mencionados, se dimensionaron las instalaciones en base a las necesidades de procesamiento de cacao poscosecha de la empresa. Para el diseño de instalaciones, se utilizó el programa de dibujo y modelado, SketchUp 2016, con el cual se esbozaron las instalaciones de fermentación, y secado en base al dimensionamiento calculado previamente. Finalmente se desarrollaron los procedimientos operativos estandarizados, POE para los procesos siguientes:

- Recepción de mazorcas de Cacao Nacional
- Quiebra de mazorcas Cacao Nacional.
- Fermentación de cacao.
- Secado de cacao.
- Almacenamiento de cacao poscosecha.

3.1.2. Estudio del proceso de fermentación mediado por levaduras

3.1.2.1. Procedimiento de Muestreo de levaduras

El muestreo de Cacao Nacional se realizó en el centro de acopio “Asociación Agropecuaria Nueva Esperanza” ubicado en la parroquia de Puerto Quito, provincia de Pichincha. Para la determinación del momento de la toma de muestra, durante las primeras 12 horas de fermentación se monitoreó la masa de cacao cada dos horas, se determinó el pH y temperatura y se recolectaron las muestras en el momento en el que se manifestó el punto de mayor crecimiento de las levaduras, de acuerdo a los métodos descritos por Schwan y Wheals (2004)

Para determinar el pH del grano en fermentación se colocaron 20 g de granos de cacao en 100 ml de agua destilada y se midió el sobrenadante con la ayuda de un potenciómetro. En cambio, la temperatura se midió con un termómetro calibrado de 0 a 100°C en 3 puntos a 7 cm de la superficie de la masa de cacao. El pH y la temperatura fueron los indicadores principales de cambio de fase durante la fermentación tal como lo mencionan (Schwan, Rose y Board, 1995). La fase de fermentación se caracteriza por que el pH inicial de la masa de cacao oscila entre 3.0 y 3.5, provocado por la presencia de ácido cítrico en la pulpa. Sin embargo, una vez iniciada la fermentación el valor de pH empieza a aumentar por el consumo del ácido cítrico (Schwan, Rose y Board, 1995).

Teniendo en cuenta que el pico de fermentación por levaduras se da a las 12 horas de iniciado el proceso, se procedió a tomar las muestras a las 12 horas después de iniciado el proceso de fermentación cuando la temperatura alcanzó 28,35°C y un pH de 4.0.

3.1.2.2. Determinación del tamaño de muestra

El cálculo del tamaño de muestra se realizó en base a un muestreo aleatorio simple, teniendo en cuenta la masa de cacao desgranado que ingresó a las labores de fermentación fue de 270, 45 kg.

Primero se determinó el peso promedio de los granos de Cacao Nacional que ingresaron al proceso de fermentación para conocer el tamaño de la población a muestrear. Para esto, se tomaron 3 muestras al azar de 50 g, 100 g y 200 g de granos debido a la variabilidad de peso existente entre granos.

Al realizar el conteo del número de granos existentes en cada una de las muestras se pudo determinar el peso de un grano al dividir el peso de la muestra entre el número de granos existentes y una vez obtenidos los pesos individuales se calculó el peso promedio. A través del peso promedio se calculó el número total de granos existentes en los 270,45 kg de masa de cacao y se obtuvo el tamaño de la población a muestrear. Posteriormente, conociendo el tamaño de la población se utilizó la fórmula que se muestra a continuación, con un porcentaje de error del 10%, un nivel de confianza de 95% y se consideró el tamaño total de la población N de 79545 granos.

$$n = \frac{\left(\frac{Z\alpha}{2}\right)^2 Npq}{NE^2 + \left(\frac{Z\alpha}{2}\right)^2 pq}$$

Ecuación 1

- a) n: Tamaño de la muestra que se calculó.
- b) N: Tamaño del universo con el que se trabajó.
- c) Z: Nivel de confianza utilizado.
- d) E: Margen de error admitido.
- e) p: Heterogeneidad usada.
- f) q: Probabilidad de fracaso.

Fórmula para calcular el tamaño de muestra.

Tomado de Galindo, 2006.

3.1.2.3. Toma y preparación de muestras de granos de cacao

La recolección de 96 muestras se llevó a cabo en tres sitios diferentes de la caja de fermentación (superficial, media e inferior), hasta obtener los 100 g requeridos

para los análisis microbiológicos y bioquímicos. Las muestras fueron colocadas en bolsas estériles y transportadas con hielo seco a $-78,5^{\circ}\text{C}$ hasta el laboratorio de microbiología de la Universidad de las Américas.

Las 96 muestras de cacao de 100 g cada una fueron mezcladas con 100 ml de agua de peptona y agitadas por 15 min en una funda plástica estéril (Adaptado de Lagunes- Gálvez *et al.*, 2006). Posteriormente se tomaron 5 ml de cada una de las muestras y se colocaron en tubos de ensayo estériles con tapa rosca, luego se adicionó 30% glicerol (p/v) en cada tubo y se almacenaron a -21°C

3.1.2.4. Cuantificación de levaduras

Se realizó conteo en placa de las 96 muestras en agar Sabouraud dextrosa con cloranfenicol luego de 2 días de incubación a 25°C .

Los resultados de los recuentos se expresaron como UFC por gramo de materia húmeda de cacao.

3.1.2.5. Aislamiento e identificación de levaduras

Por cada placa de agar de recuento, se aislaron las cepas con morfología diferente en un cultivo puro. Las colonias seleccionadas se aislaron en el medio Agar Sabouraud con cloranfenicol, y se incubaron por 24 horas para su posterior identificación. La identificación de las levaduras aisladas se realizó con la ayuda de la galería API 20C AUX (bioMerieux SA), que consiste en un sistema para la identificación bioquímica de estos microorganismos. De acuerdo a los protocolos propuestos por el Kit API las levaduras a identificar se tomaron de los cultivos puros en Agar Sabouraud, luego se preparó una solución de 2ml de NaCl al 0,85% y se extrajo una fracción de las colonias de levaduras jóvenes en crecimiento entre 18 y 24 horas hasta obtener una suspensión de levaduras de turbidez igual al patrón 2 de Macfarlan. Se transfirieron 100 μl de la suspensión en el API C Medium, luego se tomó una alícuota de 180 μl y se llenaron las 20 cúpulas de cada una de las galerías. Finalmente se incubaron por 48 a 72 horas a $29^{\circ}\text{C} \pm 2$. Posteriormente se realizó la lectura e interpretación de los perfiles

numéricos obtenidos de cada una de las galerías con la ayuda del programa de identificación *apiweb*TM.

3.1.2.6. Evaluación de la aplicación de levaduras comerciales y nativas

Para la evaluación de la fermentación controlada por levaduras nativas y comerciales se usó el diseño de caja de madera cuadrada con las siguientes dimensiones 15 x 15 x 15 cm (ancho x largo x alto).

Las cajas fueron construidas con madera de laurel, con 15 perforaciones que tienen un diámetro de 0,8 cm en el fondo para favorecer la salida del exudado. Además, estas cajas fueron suspendidas a 2 cm sobre el piso con listones de madera.

Cada caja de fermentación se llenó con 2 kg de la masa de cacao y se cubrió con hojas de banano y sacos de yute. Se determinó la temperatura y el pH cada cuatro horas durante las primeras 44 horas de fermentación con el fin de evaluar el comportamiento de las levaduras y su influencia en el proceso de fermentación.

La remoción de los granos se efectuó a las, 48, 72,96 y 120 horas de iniciado el proceso de fermentación, el cual tuvo una duración de 5 días.

Se usaron 12 cajas para la evaluación de la fermentación controlada, un Testigo y dos Tratamientos diferentes con cuatro réplicas cada uno. Como se indica a continuación en la Tabla 4.

En el ensayo se aplicó un diseño completamente al azar con 4 réplicas cada uno. El análisis de datos fue realizado con la ayuda del programa estadístico Minitab y a los resultados obtenidos se les aplicó un Análisis de varianza unidireccional con una comparación de medias por la prueba de Diferencia Significativa Honesta de Tukey.

Tabla 4.

Protocolo experimental para las cajas de fermentación.

Tratamientos	Inóculo	Concentración
T 0	Microflora natural	Desconocida porque se basa en los microorganismos que naturalmente están presentes en el proceso
T 1	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> aisladas de Cacao Nacional	10 ⁹ células/ g de pulpa de cacao
T 2	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> comercial (SafAle)	10 ⁹ células/ g de pulpa de cacao

Una vez terminado el proceso de fermentación con cada uno de los tratamientos, se procedió a evaluar el Índice de Fermentación (IF) de la masa de cacao.

3.1.2.7. Determinación del Índice de Fermentación

La prueba de corte permite obtener el (Índice de Fermentación), que se basa en los cambios en la coloración interna del grano, así como las estrías que se forman producto de la fermentación. Esta es la prueba estándar utilizada para evaluar la idoneidad de los granos de cacao para hacer chocolate (Schwan, 1998). La prueba de corte se llevó a cabo con un total de 100 granos y se determinaron los porcentajes de granos fermentados, granos violetas y granos pizarrosos. Para esto se cortaron longitudinalmente por el centro con el fin de exponer la superficie de corte máxima de los cotiledones. Ambas mitades se examinaron en plena luz del día y se colocaron en una de las siguientes categorías:

- **Granos fermentados:** Granos cuyos cotiledones muestran una coloración marrón, corteza frágil, y estrías profundas en ambas caras.
- **Granos violetas:** Granos cuyos cotiledones muestran una coloración violeta intensa, corteza adherida a la masa del grano, superficie lisa carente de estrías en ambas caras.
- **Granos pizarrosos:** Granos cuyos cotiledones muestran una coloración gris negruzco o verdoso y aspecto compacto.

La descripción cualitativa de la coloración de los granos cortados al finalizar el proceso de fermentación de Cacao Nacional aparece en la Figura 1.



Figura 1. Categorías de Calidad de Cacao.

Tomado de Gutiérrez, 2009.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Propuesta de diseño poscosecha para procesamiento de Cacao Nacional.

4.1.1. Requerimientos de materia prima

La empresa La Leyenda del Chocolate Cía. Ltda. tiene proyecciones para procesar 5.000 kg de cacao mensualmente desde enero de 2017. La política interna de esta compañía declara que el 50% del total de granos de cacao, que ingresen a producción, deben provenir de la zona de Puerto Quito. Bajo estas condiciones, las instalaciones para procesos poscosecha se deben dimensionar para procesar aproximadamente 625 kg de cacao poscosecha semanales.

4.2. Dimensionamiento de las instalaciones para los procesos poscosecha de cacao nacional.

4.2.1. Instalaciones para el proceso de fermentación del grano de cacao.

Según Rivera, Macías, Guzmán, Peña, Medina y Casanova (2012), el método utilizado para fermentar cacao no tiene una repercusión significativa en la calidad final de cacao. El método de fermentación seleccionado para el diseño de instalaciones es la fermentación por cajas en escalera, como se muestra en la Figura 2, pues este método facilita la remoción de los granos, puede adaptarse a distintos niveles de producción y los materiales requeridos para su construcción, árbol de laurel *Cordia allodora*, están disponibles en la zona de Puerto Quito.



Figura 2. Cajas de fermentación en escalera.

Tomado de Enríquez, 2010.

La empresa “la Leyenda del chocolate LTDA.” necesita 625 kg de grano poscosecha de semanales. El grano seco representa alrededor del 40% del peso total de grano fresco de la mazorca (Enríquez, 2010), por lo cual el peso de grano fresco requerido es de aproximadamente 1.562,5 kg/ semana.

Tomando en cuenta que en 1 m³ puede albergar entre 800 a 850 kg de granos (Enríquez, 2010), se determinó el volumen necesario para fermentar 1.562,5 kg, resultando un volumen total necesario de 1,96 m³. La altura y el ancho de una caja de fermentación no debe sobrepasar los 60 cm, con el fin de asegurar el correcto flujo de aire en la masa en fermentación (Cubillos, Merizalde, Correa, 2008). En base a estos cálculos y necesidades se necesitarían 2 grupos de cajas de medidas 2,86 metros de largo x 0,66 metros de ancho x 0,63 metros de alto, tomando en cuenta que la tabla de laurel se maneja en medidas de 3 cm de ancho, tal como se presenta en la Figura 3 y 4.

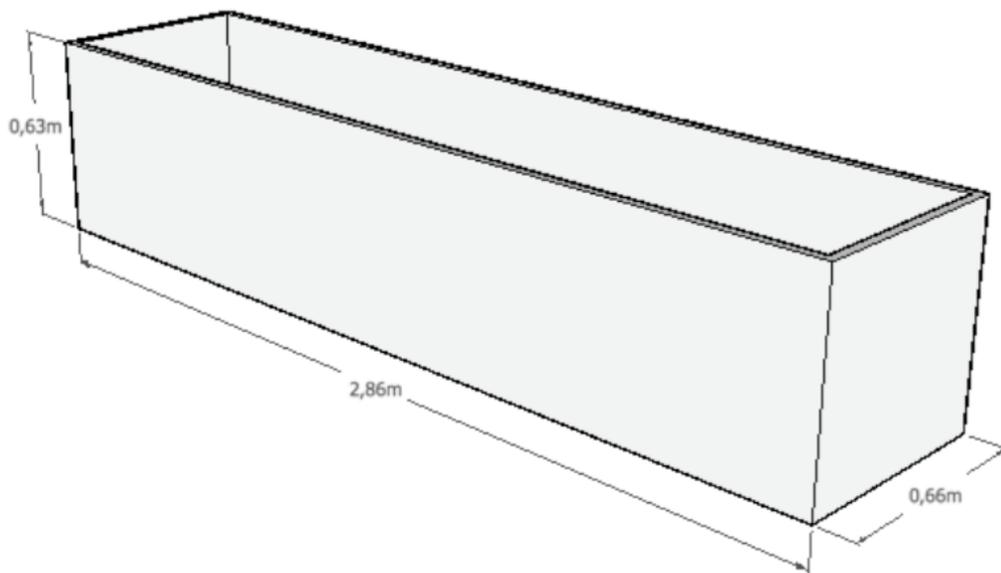


Figura 3. Caja individual de fermentación.

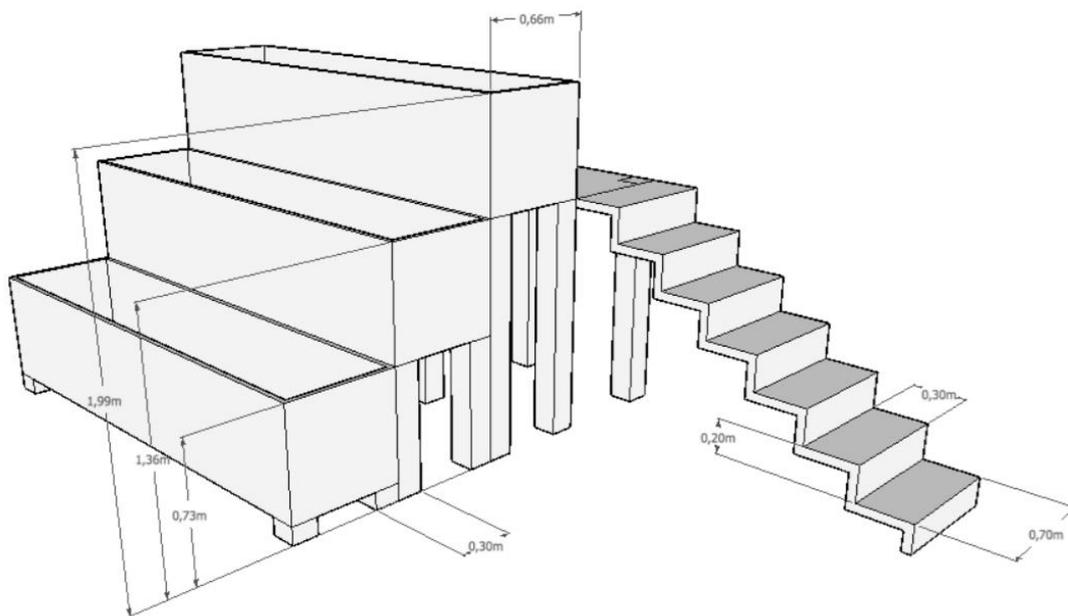


Figura 4. Caja de fermentación en escalera.

4.2.2. Instalaciones para el proceso de secado del grano de cacao.

Entre los métodos de secado disponibles se ha optado por utilizar la luz solar. Este método proporciona al grano de cacao un secado paulatino, permitiéndole completar los cambios bioquímicos internos necesarios para el desarrollo de precursores de sabor (Enríquez, 2010).

Mediante un cálculo de balance de masa se determinó que los 1.562,5 kg de granos de cacao disminuyen a 1.291,66 kg aproximadamente al finalizar el proceso de fermentación lo que representa un porcentaje de rendimiento en esta fase. Esto se justifica por la pérdida de exudados y por el metabolismo de las levaduras que consumen los azúcares del mucílago de cacao. (Camú *et al.*, 2008).

Con este método, se puede secar una cantidad máxima de 12,5 kg de granos de cacao por m² (Mahecha, Revelo, 2009). En base a este dato y al cálculo de balance de masa anterior se puede determinar que el área total requerida es de 103,43 m².

En la zona de Puerto Quito existen cultivos de Caña Guadua, *Guadua angustifolia*, por lo que se propone construir marquesinas de secado en base a este material para disminuir los costos de construcción. Dichas marquesinas tendrían el diseño presentado en la Figura 5, se requerirían tres planchas con medidas de 3 metros de ancho x 12 metros de largo x 1,80 metros de alto para cumplir con el área total calculada.

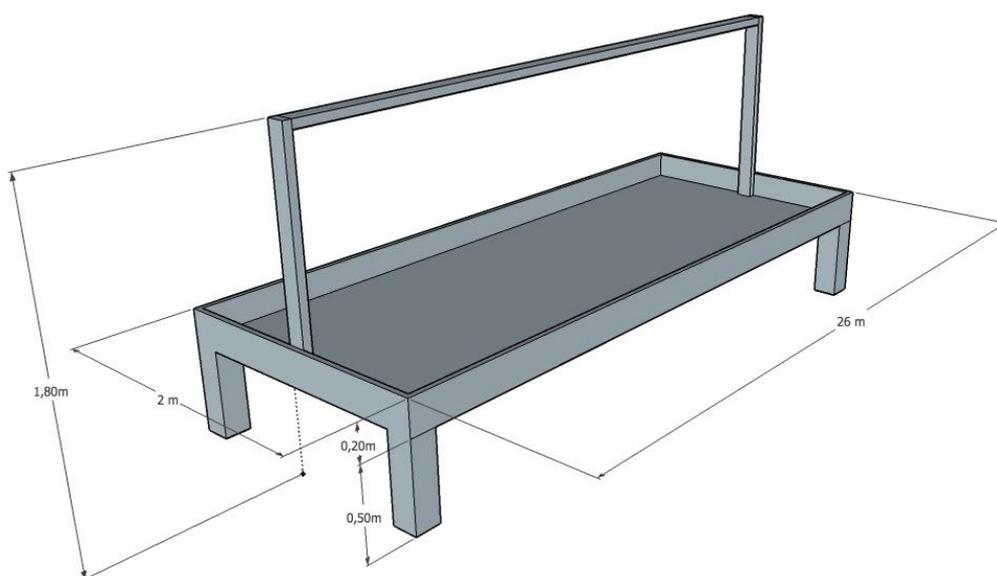


Figura 5. Marquesina de secado.

Las planchas sobre las cuales se coloca el cacao deben permitir el flujo de aire a través de ellas, por lo cual se deben realizar perforaciones de 2 a 5 mm de diámetro a lo largo de toda la plancha central de la marquesina. El plástico que recubre la estructura debe ser de color negro, para evitar que los rayos del sol caigan directamente sobre los granos de cacao de forma continua. (Enríquez, 2010).

4.2.3. Diseño de la distribución planta de procesamiento de cacao poscosecha.

El área total requerida para la disposición de las cajas de fermentación en escalera, las marquesinas de secado, la zona de recepción, la zona de

almacenaje y la zona administrativa está conformada de un total de 416,42 m².
En la figura 6 se presenta una opción para la distribución de la planta.

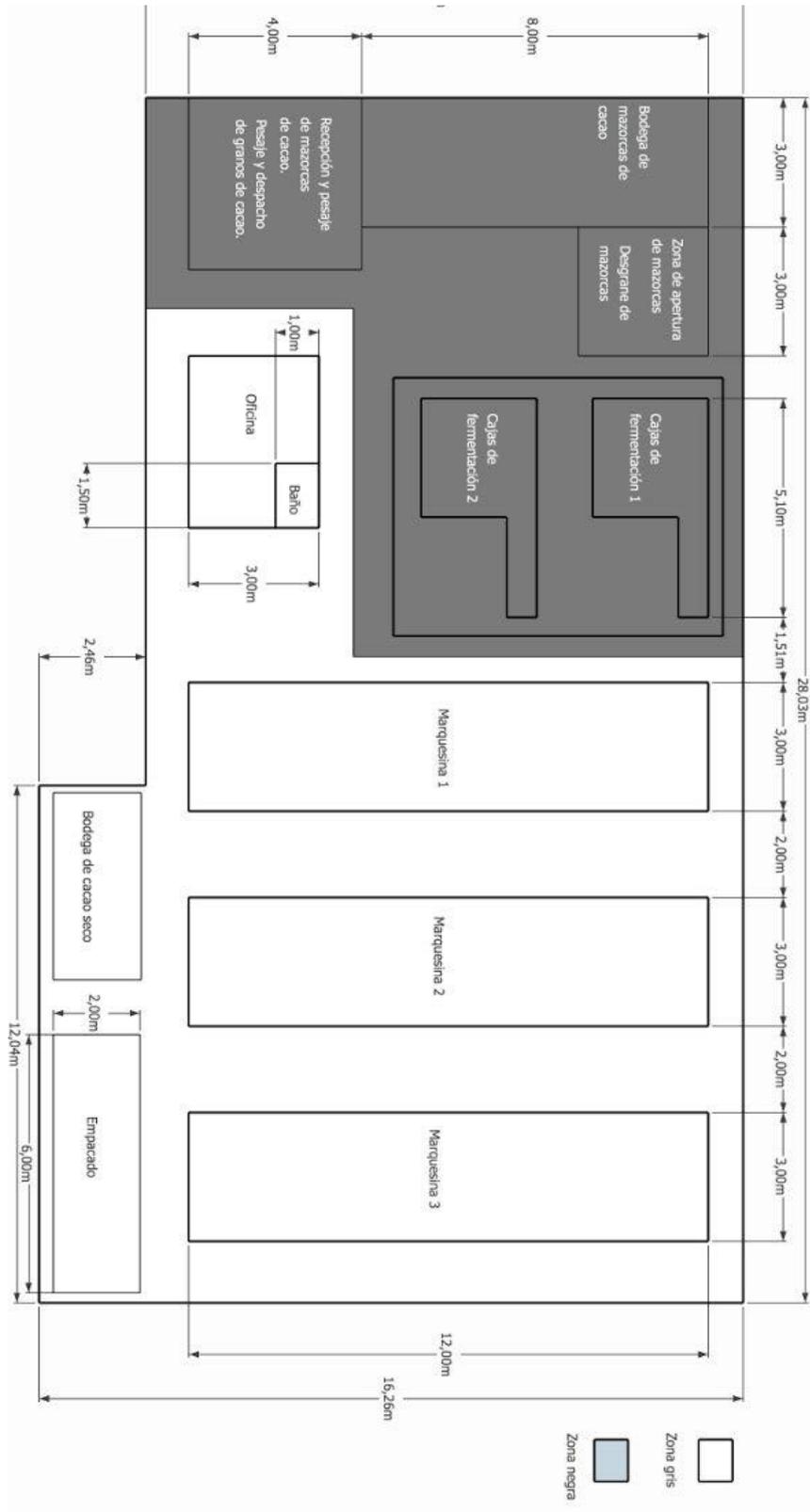


Figura 6. Diseño de distribución de la planta de poscosecha con dimensionamiento

En esta distribución se prioriza el flujo lineal de materia prima, evitando el cruce de materiales que pueda provocar contaminación por objetos extraños en el cacao poscosecha. El “Código Internacional Recomendado de Prácticas – Principios Generales de Higiene de los Alimentos” redactado por la FAO recomienda un diseño de instalaciones donde se reduzca al mínimo la contaminación (FAO, 1999), por lo cual se han separado completamente las áreas de servicio para personal de las de procesamiento.

Las mazorcas de cacao entran en la planta donde serán pesadas y se someterán a un control de calidad. Serán llevadas a la bodega de mazorcas hasta el día de su apertura y desgrane de cacao. El mismo día del desgrane iniciará la fermentación de los granos de cacao para después del tiempo descrito en los procedimientos operativos; ser transportados a las marquesinas de secado. Una vez finalizado el tiempo requerido para el secado de los granos se realizarán pruebas de control de calidad, se colocarán los granos en sacos de yute, se pesarán y se transportarán hacia la planta de procesamiento localizada en Distrito Metropolitano de Quito.

4.2.4. Propuesta de estandarización de procedimientos operativos para Poscosecha de cacao Nacional

La Tabla 5 presenta el diseño de actividades poscosecha a realizarse durante dos semanas para cumplir las necesidades de cacao semanales poscosecha de la empresa.

Tabla 5.

Cronograma de actividades poscosecha

Actividad / Día	L	M	X	J	V	S	D
Recepción de mazorcas de cacao.	X	X					
Apertura de mazorcas y extracción de granos de cacao.			X				
Inicio de fermentación.			X				
Primera remoción de granos de cacao.				X			
Segunda remoción de granos de cacao.					X		
Tercera remoción de granos de cacao.						X	
Inicio de secado.	X						
Primera remoción de granos en secado.		X					
Segunda remoción de granos en secado.			X				
Tercera remoción de granos en secado.				X			
Cuarta remoción de granos en secado.					X		
Pesado empacado y transporte a instalaciones de procesamiento.						X	

Nota: L: Lunes, M: Martes, X: Miércoles, J: Jueves, V: Viernes, S: Sábado, D: Domingo.

La empresa “La leyenda del chocolate LTDA.” Requiere suplirse de aproximadamente 625 kg de cacao poscosecha semanalmente. El proceso completo desde la llegada de la mazorca hasta el despacho de cacao poscosecha tiene una duración aproximada de 13 días cumpliendo todas las actividades descritas en la tabla 3. Estas condiciones reflejan que, para cumplir

los requerimientos semanales de cacao de la empresa, la planta de poscosecha debe trabajar durante dos semanas, pues los subprocesos de fermentación y secado tienen una duración aproximada de 5 días cada uno (Enríquez, 2010).

Las actividades de la tabla 3 han sido detalladas en los siguientes Procedimientos Operativos Estandarizados, (POE) donde se describe cómo deben ser realizadas las actividades por parte de los operarios.

POE 1: Recepción de mazorcas de Cacao Nacional: Este procedimiento (**Ver Anexo 1**), está basado en el “Manual de Cultivo de Cacao para la Amazonia ecuatoriana” del *Instituto Nacional De Investigaciones Agropecuarias (INIAP)*

POE 2: Quiebre de mazorcas Cacao Nacional: Este procedimiento (**Ver anexo 2**), está basado en el “Manual de Aplicabilidad de Buenas Prácticas Agrícolas para Cacao”.

POE 3: Fermentación de cacao: Este procedimiento (**Ver Anexo 3**), está basado en el “Manual de Cultivo de Cacao para la Amazonia ecuatoriana” del *Instituto Nacional De Investigaciones Agropecuarias (INIAP)*, y en el Manual de control de calidad en laboratorio y centro de acopio de Wildlife Conservation Society

POE4: Secado de cacao: Este procedimiento (**Ver Anexo 4**), está basado en el Manual de Cultivo de Cacao para la Amazonia ecuatoriana” del *Instituto Nacional De Investigaciones Agropecuarias (INIAP)*

4.3. Comportamiento de levaduras fermentadoras en Poscosecha.

Al inicio de la fermentación, en el momento posterior a la apertura de la mazorca, el valor del pH de la pulpa de cacao fue de $3.5 \pm 0,10$, después de 12 horas de iniciado el proceso de fermentación el valor del pH fue de $4.0 \pm 0,10$.

El registro de la temperatura inicial fue de $24.9 \text{ }^\circ\text{C}$ y durante el monitoreo se observó el aumento progresivo de temperatura, que alcanzó un valor máximo de $28.35 \text{ }^\circ\text{C}$ después de las 12 horas, como se observa en la Figura 7.

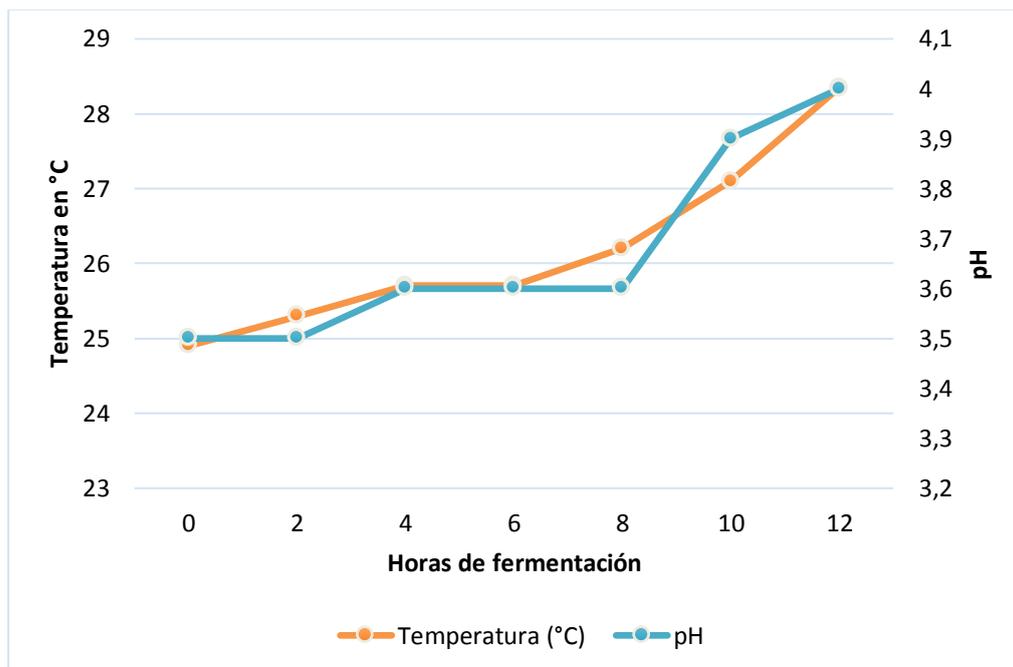


Figura 7. Curva de pH y temperatura en función del tiempo medido en °C.

Según Ardhana y Fleet (2003) y Schwan y Wheals (2004) el valor de pH inicial de 3.5 de la pulpa de cacao se debe a la presencia de ácido cítrico en su composición. Con el paso de las horas, debido al proceso de fermentación alcohólica, la concentración de ácido cítrico disminuye hasta el punto de ser indetectable a las 12 horas. Esto provoca un aumento en los valores de pH de la pulpa de cacao (Nielsen, Teniola, Ban- Koffi, Owusu, Anderson y Holzapfel, 2007). De acuerdo con Camu, De Winter, Dso, Takrama, Bernaert y De Vyust (2008) el aumento de temperatura de la masa de cacao en las primeras horas del proceso de fermentación, se debe principalmente al consumo de azúcares simples de la pulpa que se lleva a cabo por las levaduras. Según Jespersen, Nielsen y Jacobsen (2005), el consumo de la pulpa genera una reacción moderadamente exotérmica, produciendo 93,3 kJ por molécula de glucosa consumida debido a la producción de etanol y dióxido de carbono provocando un aumento significativo de temperatura en los granos de cacao. Esto se traduce igualmente en los resultados obtenidos del proceso de fermentación realizado, donde se observa una tendencia creciente tanto en los valores de temperatura como de pH.

El estudio realizado por Nielsen, Teniola, Ban-Koffi, Owusu, Anderson y Holzapfel (2006) reportó que en Ghana, la temperatura ambiente fue 28 °C al igual que la temperatura inicial de fermentación 28,5°C y alcanzó los 31°C a las 12 horas de iniciado el proceso de fermentación. Comportamientos similares fueron observados por Jespersen, Nielsen, Hønholt y Jacobsen (2004) en África Occidental donde la temperatura de fermentación inicial fue de 30°C, similar a la temperatura ambiente. En el estudio realizado en Puerto Quito, la temperatura ambiente fue de 25°C similar a la temperatura inicial de fermentación, la cual fue de 28,3°C lo cual se ajusta a las condiciones iniciales de fermentación que han mostrado estudios previos.

4.4. Identificación bioquímica de levaduras nativas en granos de cacao en fermentación

Los resultados obtenidos mediante la prueba API 20C AUX, muestran que las 18 cepas de levadura aisladas a partir de las 96 muestras, pertenecen a las siguientes especies: *Saccharomyces cerevisiae*, *Kloeckera spp.* y *Candida spp.* En la Tabla 6 se resume las características bioquímicas de las especies asiladas a través del Kit APIC 20C AUX

Tabla 6.

Características bioquímicas de las levaduras aisladas durante el proceso de fermentación

Género	# de aislados	Descripción Bioquímica																		
		GLU	GLY	2KG	ARA	XYL	ADO	XLT	GAL	INO	SOR	MDG	NAG	CEL	LAC	MAL	SAC	TRE	MLZ	RAF
Saccharomyces cerevisiae	8	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	+	+
Kloeckera spp.	5	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
* <i>Kloeckera apis</i>																				
* <i>Kloeckera apiculata</i>																				
* <i>Kloeckera japonica</i>																				
Candida spp.	4	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+
* <i>Candida pelliculosa</i>																				
* <i>Candida famata</i>																				
* <i>Candida utilis</i>																				
* <i>Candida krusei</i>																				
* <i>Candida norvegensis</i>																				
* <i>Candida glabrata</i>																				
Perfil inaceptable	1	+	+	-	-	-	-	+	+	-	+	-	+	-	+	+	+	+	-	+

Nota: El Kit API 20C AUX permitió la identificación de levaduras a nivel de género, por lo que las especies resultantes como *Kloeckera* spp. y *Candida* spp. Pueden pertenecer a cualquiera de las especies indicadas entre paréntesis. Con respecto al perfil inaceptable, es necesario hacer pruebas complementarias para obtener datos concluyentes.

Tabla 7. Significado de las abreviaturas de los compuestos

Abreviatura	Nombre
GLU	D-GLUcosa
GLY	GLYcerol
2KG	2-cetato- Gluconato cálcico
ARA	L-ARAbinosa
XYL	D-XYLosa
ADO	ADOnitol
XLT	XyLiTol
GAL	D-GALactasa
INO	INOsitol
SOR	D- SORbitol Metil- α D-
MDG	GLucopiranosida
NAG	N-Acetil- Glucosamina
CEL	D-CELibiosa
LAC	D-LACTosa
MAL	D-MALtosa
SAC	D-SACarosa
TRE:	D-TREhalosa
MLZ	D-MeLeZitosa
RAF	D-RAFinosa

Las identificaciones de estos aislamientos fueron confirmadas por perfiles de asimilación (API 20C AUX). Cabe recalcar que los perfiles de asimilación obtenidos en el estudio correspondieron a aquellos reportados por Kurtzman, Fell y Boekhout (2011).

La diversidad de especies aisladas de la fermentación realizada en Puerto Quito fue similar a las reportadas en fermentaciones realizadas en Brasil, Ghana, Malasia, Alemania, Madagascar y República Dominicana

La dominancia temprana de las especies de *Kloeckera* seguida por el crecimiento y la dominancia de *S. cerevisiae* y varias especies de *Candida* es una tendencia que se informa en la mayoría de las fermentaciones de granos de cacao, de forma que el estudio realizado es coherente con otras investigaciones.

Todas las especies de levadura aisladas durante este ensayo ya habían sido observadas durante la fermentación de cacao por Schwan y Wheals (2004).

Candida spp. y *Kloeckera spp* y fueron observadas por Carr, Davies y Dougan(1979) en Ghana y Malasia, y por Thompson, Miller y López (1997) en Belice. En un estudio realizado por Schwan, Rose y Board (1995) en Brasil se identificaron principalmente las especies *Saccharomyces cerevisiae*, *Kluyveromyces marxianus* y *Kloeckera apiculata*. En cambio en un estudio realizado por Sánchez, Daugueuet, Guiraud y Galzy, (1985) en Alemania las principales especies de levaduras aisladas durante el proceso de fermentación de cacao fueron *Saccharomyces chevalieri* y *Candida norvegensis*. En Madagascar Ravelomanana, Guiraud, Vincent y Galzy (1984) reportaron el aislamiento principalmente de *Candida krusei* y *Kloeckera apiculata*. Finalmente, *Hanseniaspora guillermondii*, *Hanseniaspora valbyensis*, *Candida glabrata*, *Candida krusei*, *Candida inconspicua*, *Candida zeylanoides* y *Pichia fermentans* fueron las principales especies de levaduras de cacao aisladas a partir de un estudio de fermentación realizado en República Dominicana (Lagunes- Gálvez, 2002).

4.5. Porcentaje de presencia de levaduras de acuerdo al género en el proceso de fermentación de Cacao Nacional

Como se mencionó anteriormente, la población de levaduras identificadas en este estudio se resume en la detección de 3 géneros diferentes; *Saccharomyces cerevisiae*, *Kloeckera spp* y *Candida spp*.

Saccharomyces cerevisiae demostró ser la especie más abundante con un 63,39% de participación en las 96 muestras, seguida de *Kloeckera spp* con una participación del 36,57%, mientras *Candida spp* tuvo una participación de 0,04%, como se indica en la Figura 8.

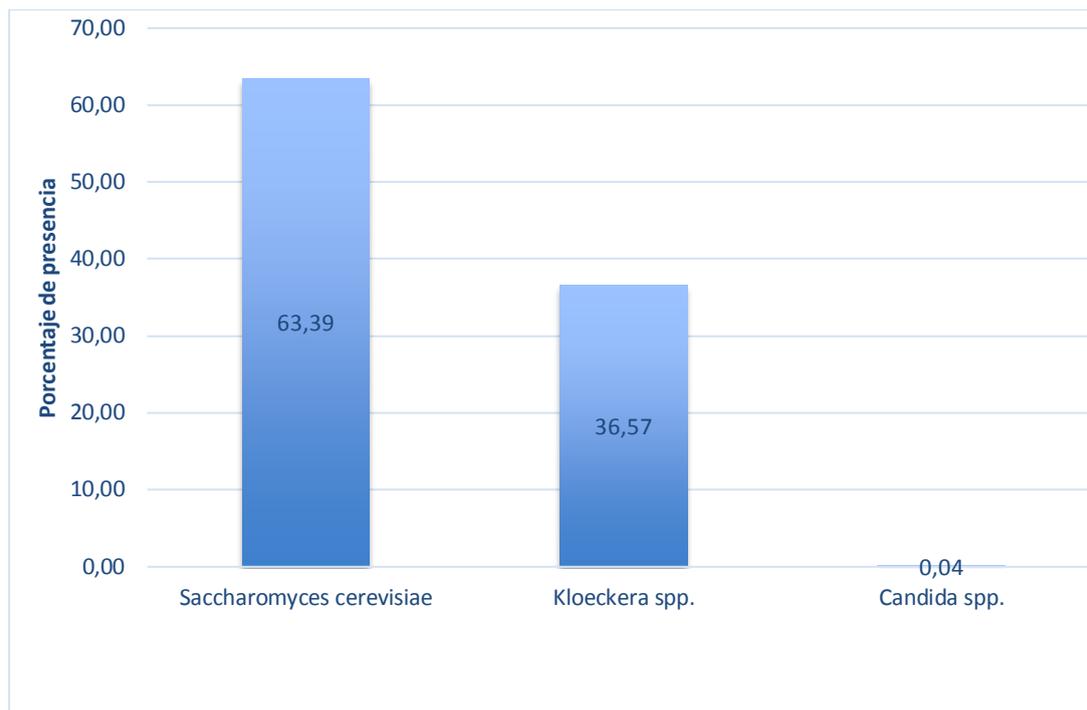


Figura 8. Porcentaje de levaduras durante las primeras 12 horas de fermentación.

Trabajos previos en fermentación de cacao realizados por Schwan (1998) demostraron que las especies de *Saccharomyces cerevisiae* se han manifestado de manera predominante durante el proceso de fermentación. *Saccharomyces cerevisiae* var *chevalieri* está presente desde el inicio de la fermentación espontánea, puede fermentar todos los azúcares de la pulpa de cacao a pH desde 3,5 hasta 4,2 y es tolerante al etanol.

Ho, Zhao y Fleet (2013) publicaron igualmente un estudio donde se muestra que durante las primeras 24 horas de fermentación de cacao las levaduras *Hanseniaspora guilliermondii* y *Kloeckera apis*, son algunas de las especies dominantes del proceso. Posteriormente se mostró que algunas especies de *Candida* empiezan su desarrollo a las 24 horas de iniciado el proceso de fermentación, pero estas se desarrollan en menor concentración durante las primeras 24 horas frente al género *Kloeckera*. Esto concuerda con el estudio

presente, pues *Kloeckera spp* es la segunda levadura dominante muy por encima de *Candida spp* pero inferior en número frente a *Saccharomyces cerevisiae*.

4.6. Análisis de pH y Temperatura de los tratamientos aplicados

Los resultados de la medición de Temperatura de cada uno de los tratamientos, se presentan en las Figura 9.

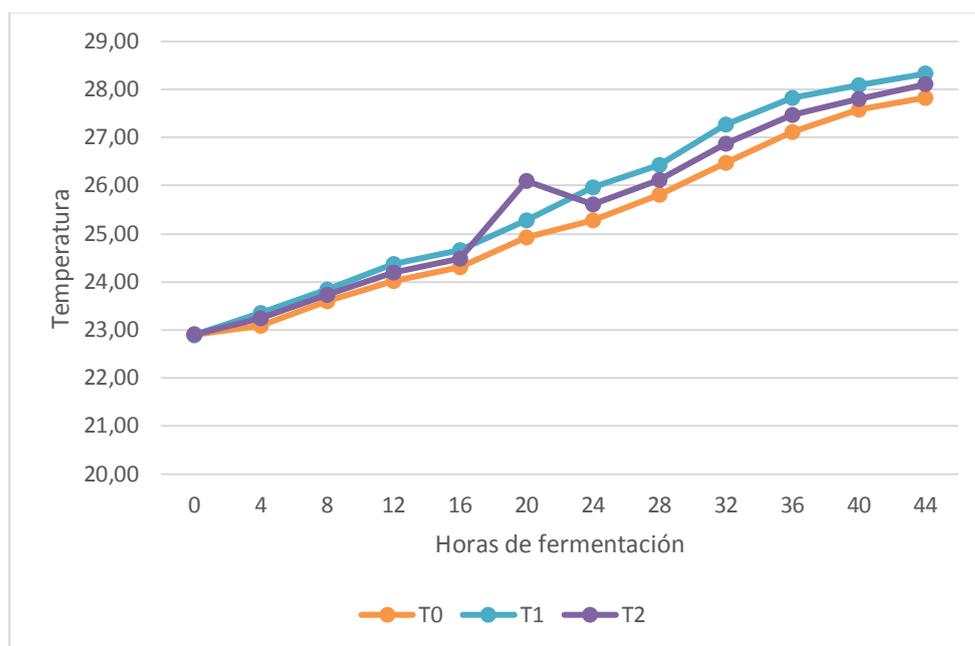


Figura 9. Promedio de Temperaturas en cada uno de los tratamientos

T0: Microflora natural.

T1: *Saccharomyces cerevisiae* aisladas de Cacao Nacional

T3: *Saccharomyces cerevisiae* comercial (SafAle)

Al inicio de la fermentación, en el momento posterior a la apertura de la mazorca, el registro de la temperatura inicial del Testigo y los dos tratamientos fue de 22.9 °C. Con el paso de las horas, se observó un aumento progresivo de temperatura resultando a las 44 horas 27,83°C, 28,33°C y 28,11 °C en el Testigo, Tratamiento 1 y Tratamiento 2 respectivamente (Figura 9).

En trabajos previos realizados por Nielsen (2007) se describieron temperaturas similares a las obtenidas durante las 44 horas de fermentación. La temperatura

de la masa de fermentación aumentó en todos los tratamientos aplicados debido a la actividad de las levaduras durante las primeras 48 horas. En el presente ensayo los datos obtenidos, no provienen de una distribución normal, posiblemente debido al número limitado de repeticiones en cada tratamiento. Se considera necesario, aumentar el número de repeticiones en futuros ensayos, lo cual permitiría obtener intervalos de confianza menores y detectar diferencias significativas en los efectos de los tratamientos (UNALMED,2012).

Al aplicar un ANOVA multifactorial al 95% de confianza, con el fin de determinar la significancia de los tratamientos realizados, se obtuvo un valor P consignado de 0,00001. Este valor es menor a la significancia de 0,05 por lo cual, se puede afirmar que por lo menos uno de los tratamientos fue estadísticamente distinto.

Para determinar cuáles medias son significativamente diferentes de otras, se realizaron Pruebas de Múltiple Rangos donde se observó que el Testigo, Tratamiento 1 y Tratamiento 2 muestran diferencias estadísticamente significativas entre sí con el 95% del Nivel de confianza. Por lo tanto, se sospecha que existe cierta variabilidad en la fermentación debido a los tratamientos aplicados, siendo el Tratamiento 1 el que mostró temperaturas superiores al testigo y al tratamiento 2.

Los promedios de pH medidos durante el ensayo se muestran en la figura 10.

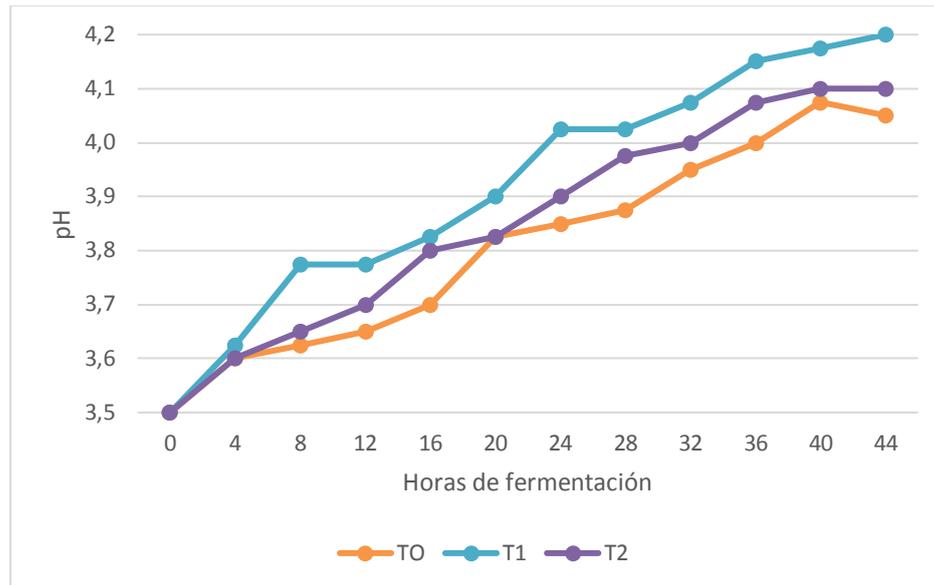


Figura 10. Promedio de pH en cada uno de los tratamientos.

T0: Microflora natural.

T1: *Saccharomyces cerevisiae* aisladas de Cacao Nacional

T3: *Saccharomyces cerevisiae* comercial (SafAle)

El registro del pH inicial, luego de colocar los granos en las cajas de fermentación fue de 3,5 para el Testigo, Tratamiento 1 y Tratamiento 2 respectivamente. Después de 44 horas de iniciado el proceso de fermentación el valor del pH fue de 4,1 en el caso del Testigo y Tratamiento 2 y de 4,2 en el Tratamiento 1, como se indica en la Figura 10

En trabajos previos realizados por Nielsen (2007) se observaron valores de pH similares a los obtenidos durante el ensayo durante las 44 horas iniciales.

En el estudio realizado en Ghana durante las primeras 48 horas de fermentación se observó un aumento de pH desde 3,94 hasta 4,12.

Al aplicar un ANOVA multifactorial al 95% de confianza, con el fin de determinar la significancia de los tratamientos realizados, se obtuvo un valor P consignado de 0,0001. Este valor es menor a la significancia (0,05) por lo cual, se puede afirmar que por lo menos uno de los tratamientos es estadísticamente distinto.

Para determinar cuáles medias son significativamente diferentes de otras, se realizaron Pruebas de Múltiple Rangos donde se observó que el Testigo, Tratamiento 1 y Tratamiento 2 muestran diferencias estadísticamente significativas entre sí con el 95% del Nivel de confianza. Por lo tanto, se sospecha que existe cierta variabilidad en la fermentación debido a los tratamientos aplicados, siendo el tratamiento 1 el que mostró un pH mayor al término de los registros a las 44 horas.

La medición de pH y temperatura se utiliza como método de control para determinar el término de la fermentación (Recalde, 2007). Sin embargo, estos parámetros cambian dependiendo de la zona, variedad de cacao y cantidad a fermentar.

4.7. Índice de fermentación de los tratamientos aplicados.

La clasificación de los granos, se realizó en base al criterio empleado por Tomlins, Baker y Dapler (1993), que toma en cuenta como granos bien fermentados aquellos de color marrón y con estrías profundas, como granos no fermentados, aquellos con superficie lisa carente de estrías y de color violeta. Finalmente considerados como pizarrosos aquellos granos de color gris negruzco y de aspecto compacto. En todos los tratamientos realizados, los granos marrones tuvieron un porcentaje mayor, seguido por los granos violetas y los menos abundantes fueron los granos pizarrosos. Resultados similares fueron obtenidos por Graziani, Ortiz, Álvarez y Trujillo (2003).

Los resultados del conteo de la prueba de corte realizada a los granos de cacao Nacional fermentados se resumen en la Figura 11 donde se puede observar el número de granos marrones, violetas, pizarrosos y el Índice de fermentación de cada uno de los tratamientos T0: Microflora natural, T1: *Saccharomyces cerevisiae* aisladas de Cacao Nacional, T2: *Saccharomyces cerevisiae* comercial (SafAle) y sus réplicas.

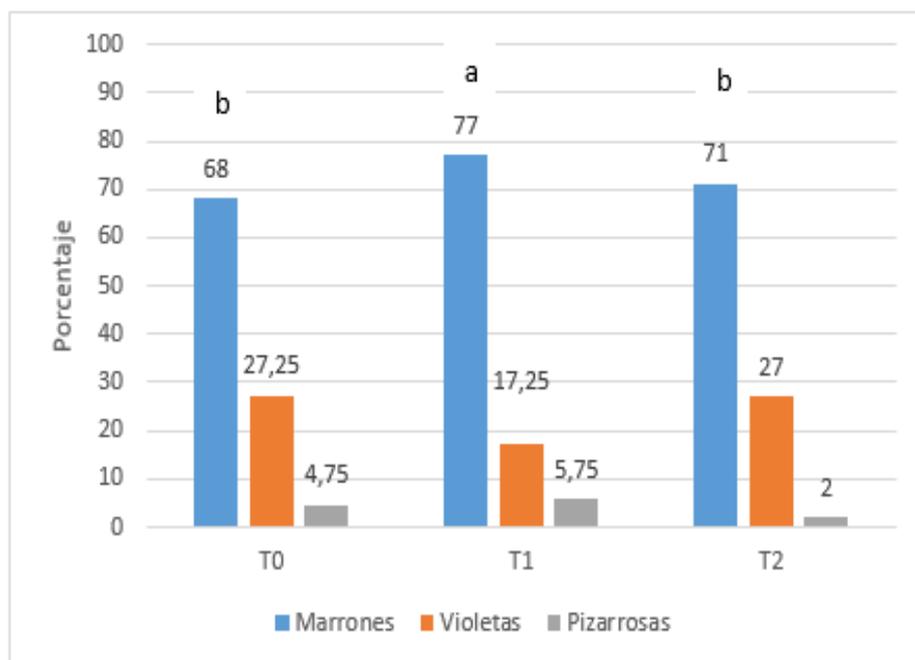


Figura 11. Porcentaje de granos marrones, violetas y pizarrosos durante la medición del Índice de fermentación.

T0: Microflora natural.

T1: *Saccharomyces cerevisiae* aisladas de Cacao Nacional

T3: *Saccharomyces cerevisiae* comercial (SafAle)

El índice de fermentación, de cada uno de los tratamientos, se muestra en la Figura 11. Adicionalmente se describe la agrupación obtenida por la prueba de comparación múltiple de Tukey sobre los granos marrones.

Estadísticamente el T2 y T0 son iguales, mientras T1 si genera una diferencia con el 95% del Nivel de confianza

Al aplicar un ANOVA unidireccional al 95% de confianza, con el fin de determinar la significancia de los tratamientos realizados, se obtuvo un valor P consignado de 0,001. Este valor es menor a la significancia (0,05) por lo cual, se puede afirmar que por lo menos uno de los tratamientos es estadísticamente distinto.

A un nivel del 5% no existe evidencia estadística para afirmar que las levaduras inoculadas ocasionan el mismo efecto sobre la fermentación. Por lo tanto, se sospecha que existe cierta variabilidad en la fermentación debido a los tratamientos aplicados.

A un nivel del 95% de confianza se espera que la levadura *Saccharomyces cerevisiae* aislada de la fermentación de cacao Nacional de la zona de Puerto Quito, aplicada en el T1, desarrolle un mayor índice de fermentación, pues su media está alrededor de 0,77 con una desviación del 0,282. La levadura *Saccharomyces cerevisiae* comercial, aplicado en T2, tiene una media de 0,71 y desviación del 0,1414 por lo cual presenta resultados inferiores. En términos estadísticos, tanto el T0, control, como el T2, *Saccharomyces cerevisiae* comercial, presentan comportamientos similares.

El índice de fermentación (IF) fue medido a los 5 días de iniciado el proceso de fermentación, empleando la norma N°442-95 COVENIN (1995).

En la Figura 11 se puede ver que el mayor valor del Índice de fermentación (IF) fue de 77 % y perteneció al Tratamiento 1 mientras que el menor valor de Índice de fermentación (IF) fue de 68% y perteneció al Tratamiento 0.

Barel (1987) establece como un Índice de fermentación óptimo (IF), un porcentaje mayor o igual al 60% de granos color marrón en la masa fermentante. Es así que todos los Tratamientos incluido el Testigo se encuentran en un rango aceptable, sin embargo el T1 ha mostrado ser el más efectivo.

Para el análisis estadístico de los datos obtenidos se realizó un Análisis de Residuos por la Prueba de Ryan-Joiner y determinar si los datos se ajustan a una distribución normal, como se indica en la Figura 12.

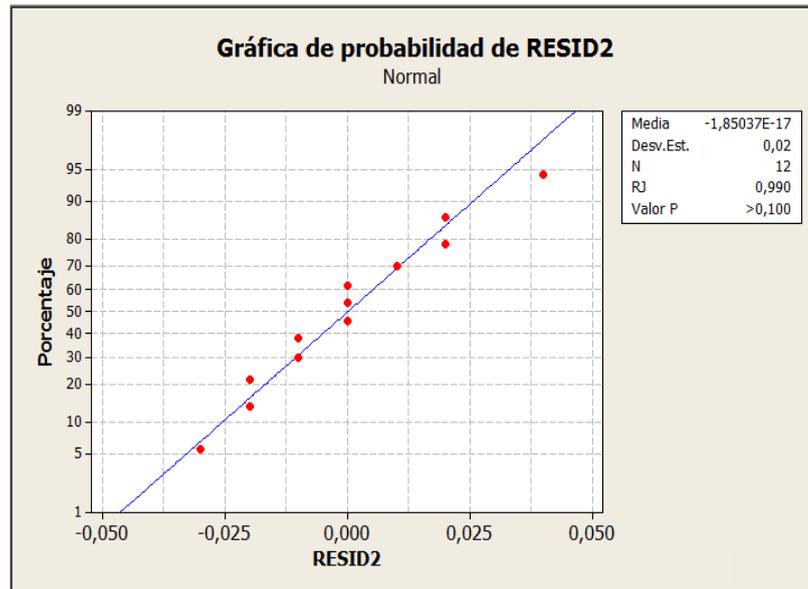


Figura 12. Gráfica de probabilidad de RESID2

Se obtuvo un (valor P) de 0,1. Este valor es mayor que el nivel de significancia (0,05) por lo cual se puede afirmar que los datos del ensayo provienen de una distribución normal.

5. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1. CONCLUSIONES

El diseño de planta de beneficio para la empresa “La leyenda del chocolate LTDA.” está calculado para una producción semanal de 625 kg de cacao en poscosecha. Este diseño propone una infraestructura para la recepción y pesaje de mazorcas de cacao, almacenaje de las mismas, apertura de las mazorcas y extracción de los granos, cajas en escalera para la fermentación y marquesina en base a caña guadua para el secado por luz solar en un área total de 416,42 m^2 .

Durante el proceso de poscosecha del cacao, se realizan actividades fundamentales para el correcto funcionamiento del proceso. Las actividades como el control de materia prima, apertura de la mazorca, remociones de cacao en fermentación y secado deben realizarse de acuerdo a lo indicado en los Procedimientos Operativos Estandarizados explicados detalladamente en los anexos pues el mal manejo de alguna de estas actividades puede provocar un deterioro y disminución en la calidad final del grano. Es así que los POE propuestos se enfocan en cómo realizar las actividades antes mencionadas y el desarrollo de los registros para su control.

Los resultados de las pruebas realizadas con el Kit Api 20C AUX mostraron que las levaduras aisladas del proceso de fermentación de Cacao Nacional proveniente de la zona de Puerto Quito pertenecen a los géneros *Saccharomyces cerevisiae*, *Kloeckera spp.* y *Candida spp.*

En el ensayo realizado en las cajas de fermentación tanto el Testigo como el Tratamiento 1 y 2 mostraron una temperatura inicial de 22.9°C. Sin embargo, al término de las 44 horas el Tratamiento 1 alcanzó una temperatura de 28,33°C resultado significativamente superior al Tratamiento 2 con 28.11°C y al Testigo

con 27,83°C, se presume que la temperatura del Tratamiento 1 fue superior por el hecho de usar *Saccharomyces cerevisiae* aisladas de Cacao Nacional.

En el ensayo realizado en las cajas de fermentación, el pH inicial fue de 3,5 para cada uno de los Tratamientos y el Testigo. Sin embargo, luego de transcurridas 44 horas de fermentación tanto el Testigo como el Tratamiento 2 alcanzaron un pH de 4,1 a diferencia del tratamiento 1 que alcanzó un pH de 4,2.

La inoculación de *Saccharomyces cerevisiae* aislada de Cacao Nacional de la zona de Puerto Quito, presentó un promedio de Índice de Fermentación de 77%, resultado significativamente superior al tratamiento con *Saccharomyces cerevisiae* comercial (SafAle) 71% y al testigo 68%.

5.2. RECOMENDACIONES

Para la identificación a nivel de especie, el Kit API 20C AUX propuso la realización de pruebas complementarias de 3 posibles especies diferentes de *Kloeckera spp.* y 6 posibles especies distintas de *Candida spp.* por lo que se recomienda realizarlas en estudios posteriores. Actualmente se están empleando técnicas moleculares para la identificación de microorganismos debido a la especificidad, sensibilidad y rapidez de estos métodos, por lo que se recomienda realizar la identificación de las levaduras aisladas usando las secuencias de las regiones ITS1, ITS2 o las secuencias del gen ARN 5.8s.

El diseño de la planta de beneficio propuesto fue realizado en base a requerimientos técnicos, logísticos y dimensionales proporcionados por la empresa. Sin embargo, hay actividades adicionales (lavado y pulido de granos de cacao) que pueden llevarse a cabo con el fin de mejorar la calidad del cacao. Se recomienda estudiar la eficacia de estas actividades con el fin de determinar su impacto en el proceso poscosecha de cacao y diseñar POE específicos de estas actividades.

En el proceso de fermentación de cacao se desencadenan varias reacciones bioquímicas al interior del grano, producto de la actividad de diferentes tipos de microorganismos. Se recomienda el estudio de los compuestos bioquímicos que

intervienen en el proceso de fermentación y así hallar relación entre su concentración y la calidad final del grano.

El índice de fermentación por método de corte basa sus resultados en el color de las almendras al terminar el proceso. Sin embargo, esto no permite concluir que se hayan desarrollado correctamente los precursores del sabor en los granos de cacao fermentados. Se recomienda realizar la evaluación organoléptica como ensayo adicional a la prueba de corte, para determinar la eficacia de los tratamientos en fermentación de cacao.

Se recomienda realizar el mismo estudio empleando otras variedades de Cacao, en diferentes zonas y variando factores que pueden influir durante la fermentación.

REFERENCIAS

- Amores, F., Agama, J., Suárez, C., Quiroz, J., Motato, N. (2009). *EET 575 y EET 576 Nuevos clones de Cacao Nacional para la zona central de Manabí*. Boletín divulgativo N° 346. Iniap: Pichilingue.
- Andrade, N (2009). Manual de cultivo de cacao para la Amazonia ecuatoriana. Recuperado el 10 de noviembre de 2016 de http://www.canacacao.org/uploads/smartsection/19_Manual_para_cultivo_de_cacao.pdf
- Anecacao (2015). Cacao CCN 51. Recuperado el 6 de noviembre de 2016 de <http://www.anecacao.com/es/quienes-somos/cacaoccn51.html>.
- Anecacao (2015). Historia del cacao. Recuperado el 18 de septiembre de 2016 de <http://www.anecacao.com/index.php/es/quienes-somos/historia-del-cacao.html>.
- Anecacao (2015). Historia del Cacao. Recuperado el 6 de noviembre de 2016 de <http://www.anecacao.com/es/quienes-somos/historia-del-cacao.html>
- Anecacao (2015). Manual del Cultivo de Cacao Anecacao. Recuperado el 18 de septiembre de 2016 de <http://www.anecacao.com/es/servicios/articulos-tecnicos/floracion-fructificacion-y-cosecha-del-cacao.html>.
- Anecacao (2015). Retos y objetivos del cacao en el 2015. Sabor Arriba. 3° Edición
- Aprocafa (2015). Exportación de cacao y elaborados de cacao. Recuperado el 19 de abril de 2015 de <http://www.aprocafa.net/#!/Cuadro#1/zoom/cq1b/i0e5e>
- Ardhana, M., Flett, G. (2003). The microbial ecology of cocoa bean fermentations in Indonesia. *International Journal of Food Microbiology*. 86. 87– 99.
- Ardhana, M (1990). *Microbial ecology and biochemistry of cocoa bean fermentations* (PhD thesis). University of New South Wales, Australia
- AusAID (1998). *Cocoa Processing Methods for the Production of High Quality Cocoa in Vietnam*. Recuperado el 18 de septiembre del 2016 de http://www.canacacao.org/uploads/smartsection/19_Cocoa_fermentation_manual_Vietnam.pdf.
- Banco Central del Ecuador (2014). Datos estadísticos de exportación de cacao. Recuperado el 20 de septiembre de 2016 de <https://www.bce.fin.ec/index.php/component/k2/item/327-ver-bolet%C3%ADn-anuario-por-a%C3%B1os>
- BAREL, H. 1987. Délai d'écabossage. Influence sur les rendements et la qualité du cacao marchand et du cacao torréfié. *Café Cacao Thé*. 31(2), 141-150.
- Barel, M (1997). *La fermentation du cacao: le moyen de l'apprécier et de la maîtriser*. *Revue des Industries Alimentaires et Agricoles* 14, 211–214.

- Batista, L. (2009). *Guía Técnica*, El Cultivo de Cacao. Recuperado el 11 de octubre de 2016 de <http://www.fundesyam.info/biblioteca.php?id=3096>
- Bernal, M. (2007). La calidad del cacao ecuatoriano será evaluada por tercera vez. *El Universo*. Recuperado el 19 de abril de 2015 de <http://www.eluniverso.com/2007/08/25/0001/71/43AA6F0F39F54A2BAC534C16B90FDBC2.html>. by yeast. *J. Inst. Brew*, 85:149–156.
- Camu, N., De Winter, T., Ddo, S., Takrama, J., Bernaert, H., y De Vuyst, L. (2008). *Fermentation of cocoa beans: influence of microbial activities and polyphenol concentrations on the flavour of chocolate*. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 88:2288–2297.
- Carr, J., Davies, A., y Dougan, J. (1979). *Cocoa fermentation in Ghana and Malaysia II*. *Academic Press London*, 25:275-292
- COVENIN 442:1995. Granos de cacao. Prueba de corte. (Primera revisión). Recuperado el 8 de diciembre de 2016 de <http://www.sencamer.gob.ve/sencamer/normas/442-95.pdf>
- Cubillos, G., Merizalde, G., Correa, E. (2008). Manual del beneficio del cacao. Recuperado el 5 de diciembre de 2016 desde https://chocolates.com.co/sites/default/files/default_images/manual_beneficio_cacao.pdf.
- Dostert, N., Roque, J., Cano, A., La Torre, M., y Weigend, M. (2011). Hoja botánica: Cacao. Recuperado el 9 de noviembre de 2016 de http://www.botconsult.com/downloads/Hoja_Botanica_Cacao_2012.pdf
- Enríquez (1985). Curso sobre el cultivo del cacao. 1ra edición. Catié: Costa Rica.
- Enríquez (2007). CORPEI, Informe de Proyecto Mapa de Sabores. Recuperado el 10 de noviembre de 2016 de <http://orton.catie.ac.cr/REPDOC/A7704E/A7704E.PDF>
- Enríquez (2010). Cacao Orgánico. Guía para productores ecuatorianos. Quito-Ecuador. Editorial: INIAP
- Forsyth, W., y Quesnel, V. (1963). *Mechanisms of cocoa curing*. *Adv. Enzymol.*, 25:457–492.
- Freire, J., Ríos, F. (2006). Programa de capacitación en la cadena de cacao. Quito- Ecuador. Editorial: Camaren.
- Gálvez, S., Loiseau, G., Paredes, J., Barel, M Guiraud, J. (2006), *Study on the microflora and biochemistry of cocoa fermentation in the Dominican Republic*. *International Journal of Food Microbiology* 114 (2007), 124–130.
- Gauthier, B., Guiraud, J., Vincent, J., Porvais, J., y Galzy, P. (1977). *Comments on yeast flora from traditional fermentation of cocoa in the Ivory Coast*. *Rev. Ferment. Ind. Aliment*, 32:160–163.
- Gobierno de la provincia de Pichincha. (2012). Caracterización municipal y parroquial del Cantón Puerto Quito. Recuperado el 22 de septiembre de 2016 de

- http://www.pichincha.gob.ec/phocadownload/pgd/2carcantyparr/5prtoquito/102_cantonpuertoquito.pdf
- Graziani, L., Ortiz., Álvarez., y Trujillo, A. (2003). FERMENTACIÓN DEL CACAO EN DOS DISEÑOS DE CAJAS DE MADERA. *Agronomía Tropical*, 53(2) Maracay
- Gutiérrez, M. (2009). “Guía de Gestión de Calidad en Centro de Acopio, Secado y Fermentación de Cacao”. Recuperado el 9 de diciembre de 2016 de http://agroaldia.minag.gob.pe/biblioteca/download/pdf/manuales-boletines/cacao/guia_gestion_calidad.pdf
- Hardy, F (1961). Manual de Cacao. Recuperado el 11 de octubre de 2016 de <http://orton.catie.ac.cr/REPDOC/A8425E/A8425E.PDF>
- Ho, V., Zhao, J., Y Fleet, G (2014). Yeasts are essential for cocoa bean fermentation. *International Journal of Food Microbiology* 174 (2014), 72–87.
- IICA (2007). Estudio de caso: denominación de origen “cacao arriba”. Recuperado el 10 de octubre de 2016 de <http://orton.catie.ac.cr/REPDOC/A7704E/A7704E.PDF>
- INIAP (1999). Manual del cultivo de cacao. Quevedo- Ecuador. Editorial: Estación Experimental Pichilingue.
- INIAP (2012). Influencia de la Agronomía y cosecha sobre la calidad de cacao. Recuperado el 10 de octubre de 2016 de http://www.iniap.gob.ec/nsite/index.php?option=com_content&view=article&id=795:iniap-da-recomendaciones-sobre-como-obtener-una-buena-calidad-del-cacao-fino-de-aroma&catid=97&Itemid=208
- Irie, G., Zahouli, S., Tagro, G., Monke, F., Ban-Koffi, L Y Gnopo Nemli, J. (2010). Effect of Drying Methods on the Chemical Quality Traits of Cocoa Raw Material. *Advance Journal of Food Science and Technology* 2(4): 184-190
- Jayas, D., y Sokhansanj, J (1989). Thin layer drying of barley at low temperatures. *Can. Agr. Eng*, 31:21-23.
- Jespersen, L., Nielsen, D.S., Honholt, S., y Jakobsen, M., (2005). *Occurrence and diversity of Yeast involved in fermentation of West African cocoa beans. FEMS Yeast Research*, 5(2005), 441–453.
- Jinap, S., J. Thien y T. Yap. (1994). Effect of drying on acidity and volatile fatty acids content of cocoa beans. *J. Sci. Food Agric*. 65:67-75.
- Kurtzman, C., Fell, J., y Boekhout, T. (2011). *The Yeast, a Taxonomic Study*. United States of America. Editorial: Elsevier.
- Lagunes-Gálvez, S. (2002). *Isolement et caractérisation de bactéries acétiques provenant de la fermentation du cacao*. DEA. Ecole Doctorale Science et Procédé et Biologiques et Industriels. Université de Montpellier II, Montpellier. 34 pp.

- Larrea, M. (2008). EL CULTIVO DE CACAO NACIONAL: UN BOSQUE GENEROSO. Recuperado el 11 de octubre de 2016 de <http://www.flacsoandes.edu.ec/libros/digital/43804.pdf>
- Lehrian, D.W., Patterson, G.R., (1984). *Cocoa fermentation*. Vol.5. Switzerland:Verlag Chemie, Basel.
- López, A. (1974). *The contribution of volatile compounds to the flavour of chocolate and their development during processing*. (PhD Thesis). University of the West Indies/Cacao Research Unit
- Mahecha, R., Revelo. J. (2009). Convenio de Concertación para una Producción más Limpia en el Subsector Cacaotero - Cacao Orgánico. Recuperado el 5 de diciembre de 2016 a partir de http://www.cam.gov.co/sitio/images/documents/phocadownload/produccion_sostenible/Guia_cacaocultores.pdf
- Mateo, J., Jiménez, M., Huerta, T., y Pastor, A. (1991). Contribution of different yeasts isolated from of Monastrell grapes to the aroma of wine. *Int. J. Food Microbiology*, 14:153–160.
- Moncayo (2015). Importancia productiva del cacao ecuatoriano. Recuperado el 19 de abril de 2015 de <http://www.anecacao.com/es/servicios/articulos-tecnicos/importancia-productiva-del-cacao.html>
- Nielsen,D., Teniola,O., Ban- Koffi,L., Owusu,M., Anderson,T., y Holzapfel,W. (2007). *The microbiology of Ghanaian cocoa fermentations analysed using culture-dependent and culture-independent methods*. *International Journal of Food Microbiology*. 114 (2007) 168–186
- Ostovar, K., Keeney, P. (1973). Isolation and characterization of microorganisms involved in the fermentation of Trinidad's cacao beans. *J. Food Sci.* 38:611–617.
- Pettipher, G. (1986). *Analysis of cocoa pulp and the formulation of a standardised artificial cocoa pulp medium*. *J. Sci. Food Agricult.*, 37:297–309.
- Quiroz, J. (1994). Caracterización fenotípica del Cacao Nacional en Ecuador. Boletín técnico N° 71. Iniap: Pichilingue.
- Ramírez, P. (2006). Estructura y dinámica de la cadena de cacao en el Ecuador: sistematización de información y procesos en marcha. Documento técnico, GTZ
- Ravelomanana, R., Guiraud, J., Vincent, J. y Galzy, P. (1984), *Étude de la flore de levures de la fermentation traditionnelle du cacao a Madagascar*. *Revue Des Fermentations et des Industries Alimentaries* , 39(4), 104-106.
- Reyes, H. (1999). La calidad en el cacao. Recuperado el 19 de abril de http://sian.inia.gob.ve/repositorio/revistas_tec/FonaiapDivulga/fd61/calica c.html.
- Reyes,H., Viva,J., y Romero,A (2000). La calidad del cacao: II. Cosecha y fermentación. FONAIAP DIVULGA No. 66

- Rivera, R., Mecías, F., Guzmán, A., Peña, M., Medina, H., Casanova, L. (2012). Efecto del tipo y tiempo de fermentación en la calidad física y química del cacao tipo Nacional. *Revista de Ciencia y Tecnología UTEQ*, 5(1), 7-12.
- Roelofsen, P. (1958). Fermentation, drying, and storage of cocoa beans. *Adv. Food Res*, 8:225–296.
- Rombouts, J (1952). *Observations on the microflora of fermenting cocoa beans in Trinidad. Proc. Soc. Appl. Bacteriol*, 15:103–111.
- Sánchez, J., Daugueuet, G., Guiraud, J., Vincent, J. y Galzy, P. (1985), *A study of yeast flora and the effect of pure culture seeding during the fermentation process of cocoa beans. Lebensmittel-Wissenschaft und Technologie*, 18(2), 69-75.
- Schwan, R. (1998). Cocoa Fermentations Conducted with a Defined Microbial Cocktail Inoculum. *American Society for Microbiology*, . 64(4), 1477–1483
- Schwan, R., Rose, A., y Board, R. (1995). *Microbial fermentation of cocoa beans, with emphasis on enzymatic degradation of the pulp. J. Appl. Bacteriol. Symp. Supp*, 79:96–107.
- Schwan, R., Wheals, A., (2004). *The Microbiology of Cocoa Fermentation and its Role in Chocolate Quality. Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 44(4), 205–221.
- Soria, J (sf) *Breve historia del cultivo de cacao en Ecuador*. Recuperado el 18 de septiembre de http://www.ecuacocoa.com/espanol/index.php?option=com_content&task=view&id=12&Itemid.
- Suomalainen, H., y Lehtonen, M. (1979). The production of aroma compounds by yeast. *J. Inst. Brew.*, 85:149–156.
- Thompson, S., Miller, .B., y López, A. (1997). *Cocoa and Coffee. In Food Microbiology Fundamentals and Frontiers*, pp. 649–661..
- TOMLINS, K., D. BAKER, P. DAPLIN and D. ADOMAKO. 1993. *Effect of fermentation and drying practices in the chemical and physical profiles of Ghana cocoa. Food Chem*, 46:257-263
- Vicepresidencia del Ecuador. (2015). Diagnóstico de la Cadena Productiva del Cacao en el Ecuador. Recuperado el 23 de enero de 2017 de <http://www.vicepresidencia.gob.ec/wp-content/uploads/2015/07/Resumen-Cadena-de-Cacao-rev.pdf>

ANEXOS

Anexo 1:

Código: P_0000	LEYENDA DEL CHOCOLATE	Versión: 1
Fecha implementación: Enero de 2017	PROCEDIMIENTO OPERATIVO ESTANDARIZADO Recepción de Mazorcas de Cacao Nacional	

Responsable:	Trabajador agrícola	Área:	Planta de beneficio	Ubicación:	Elija un elemento.
Nombre POES:	Recepción de mazorcas Cacao Nacional	Contacto:		Frecuencia:	Diario

Sección 1| INFORMACIÓN GENERAL

Formulario y registro de control:

Acciones iniciales

1. Asignar personal responsable de recepción de Materia Prima.
2. Verificar el estado sanitario de las instalaciones en donde se realizará el procedimiento.
3. Verificar existencia de los recursos necesarios.

Recursos:

1. Horario de recepción de Materia prima.
2. Overol.
3. Botas de caucho.

Sección 2| PROCEDIMIENTOS

Procedimiento de recepción de materia prima:

1. Recepción de las mazorcas de cacao
2. Pesar y revisar las mazorcas de acuerdo con los parámetros establecidos en el Registro de recepción de materia prima. (**Ver Anexo 1**)
3. Conforme a los resultados obtenidos de la revisión de calidad establecer la Aceptación o Rechazo de la materia prima recibida.
4. Si el lote es aceptado establecer la identificación del Lote de recepción, lo que permitirá tener control del producto en el proceso y el seguimiento del proveedor.
5. Si existen dudas respecto del estado del fruto, golpearlo con los dedos y si se produce un sonido hueco, es señal de que el fruto está maduro

Recursos:

1. Balanza.
2. Esfero.

Procedimiento de rechazo de materia prima:

1. Rechazar mazorcas verdes, mazorcas pintonas, mazorcas enfermas, mazorcas dañadas por animales y mazorcas sobremaduras.

Sección 3| DOCUMENTACIÓN

- Registro de Recepción de materia prima
- Ficha técnica de Cacao Nacional

Sección 4| REFERENCIAS NORMATIVA

- Manual de Aplicabilidad de Buenas Prácticas Agrícolas para Cacao
- Políticas de Calidad de la empresa "Leyenda de chocolate".

Anexo 2:

Código: P_ 0001	LEYENDA DEL CHOCOLATE	Versión: 1
Fecha implementación: junio de 2016	PROCEDIMIENTO OPERATIVO ESTANDARIZADO	
	Quiebra de mazorcas de Cacao Nacional	

Responsable:	Trabajador agrícola	Área:	Planta de beneficio	Ubicación:	
Nombre POES:	Quiebra de mazorcas de cacao Nacional	Contacto:		Frecuencia:	Diario

Sección 1| INFORMACIÓN GENERAL

Acciones iniciales

1. Asignar personal responsable del proceso de desgrane
2. Verificar el estado sanitario de las instalaciones en donde se realizará el procedimiento.
3. Verificar existencia de los recursos necesarios.

Recursos:

4. Overol.
5. Botas de caucho.

Sección 2| PROCEDIMIENTOS

Procedimiento de desgrane

1. Las mazorcas de cacao se agrupan y se descartan aquellas que no han alcanzado el grado de madurez requerido o presentan alguna enfermedad.
2. Determinar si se inicia el proceso de quiebra o se almacena hasta que alcance el grado de madurez óptimo.
3. Realizar un corte longitudinal en la mazorca, de preferencia en forma oblicua con un machete corto sin filo de 30-40 cm de largo para evitar cortar las almendras
4. Separar las almendras manualmente, deslizando los dedos a lo largo de la vena central de la mazorca.
5. Amontonar las almendras sobre lonas plásticas destinadas únicamente a esta labor.
6. No mezclar almendras cosechadas en diferentes días.
7. Realizar control de calidad de las almendras frescas antes de ser transportadas a los cajones de fermentación. (Ver Anexo 2)
8. La pulpa o mucílago de los granos frescos deben tener un adecuado contenido de sólidos solubles, entre 14 y 20 °Brix y un pH óptimo, entre 3–3,5
9. Para medir el pH se colocan 20 g de granos de cacao en 100 ml de agua destilada , medir el sobrenadante con un potenciómetro y registrar
10. Para determinar los sólidos solubles extraer 3 ml de pulpa de cacao en el vaso de precipitación y colocar una gota en el prisma del Refractómetro, cerrar la tapa y dirigir el instrumento hacia la luz para realizar la lectura y registrar.
11. Colocar las almendras dentro de un sitio limpio y libre de contaminación.
12. Separar las cascaras, granos germinados, granos negros o afectados por enfermedades, para evitar que las almendras sanas se contaminen.

Recursos:

1. Machetes cortos sin filo de 30- 40 cm
2. Mazos de madera
3. Lonas plásticas
4. Potenciómetro
5. Refractómetro
6. Gotero
7. Vaso de precipitación
8. Agua destilada
9. Balanza

Anexo 3:

Código: P_ 0002	LEYENDA DEL CHOCOLATE	Versión: 1
Fecha implementación: enero de 2016	PROCEDIMIENTO OPERATIVO ESTANDARIZADO Fermentación de granos de Cacao Nacional	Página 64 de 79

Responsable:	Trabajador agrícola	Área:	Planta de beneficio	Ubicación:	Elija un elemento.
Nombre POES:	Fermentación de granos de Cacao Nacional	Contacto:	.	Frecuencia:	Diario

Sección 1 | INFORMACIÓN GENERAL

Recursos:

Acciones iniciales

1. Asignar personal responsable del proceso de fermentación.
2. Verificar el estado sanitario de las instalaciones en donde se realizará el procedimiento.
3. Verificar existencia de los recursos necesarios.

6. Overol.
7. Botas de caucho.

Sección 2 | PROCEDIMIENTOS

Procedimiento de fermentación:

1. Colocar las almendras frescas en cajones de fermentación den escalera de madera dura de 2.86m x 0.66m x 0.66m
2. Tomar la temperatura y pH de los granos de cacao y anotar en el **Registro para control de calidad durante la fermentación(Ver Anexo 3)**
3. Tapar los cajones con hojas de banano y sacos de yute para conservar la temperatura de la masa de fermentación
4. Dejar reposar la masa de cacao durante 48 horas antes de ser removido.
5. La remoción consiste en mover las almendras lentamente con la ayuda de una pala, de modo que las que se ubican en la parte inferior de la caja, se ubiquen en la parte superior.
6. Luego de las 48 horas, remover la masa de cacao y tomar la temperatura y pH .(Realizar las mediciones a la misma hora)
7. Una vez removidas las almendras, se cubren nuevamente y se remueven a las 72, 96, y 120 horas
8. En cada remoción se debe prevenir la formación de bolsas de aire para evitar el crecimiento de mohos o aglomeración de almendras.
9. Se debe llevar anotaciones de temperatura y pH en el **Registro para control de calidad durante la fermentación** después de realizar cada volteo a la masa de cacao.
10. Para dar paso al proceso de secado, tomar varios granos de cacao luego de las 144 horas y abrirlos con una navaja, observar si presentan una forma arriñonada, color café pardo u oscuro y al presionarlo exuda un líquido color chocolate o vino tinto
11. Además se pueden realizar pruebas de calidad en los granos durante la fermentación para verificar que se

Procedimiento de fermentación:

Prueba del aro de café:

1. La prueba se realiza a partir del tercer día
2. aparece un aro de color café
3. Separar 5 granos de diferentes partes del cajón, cortar longitudinalmente y observar la formación del aro café entre la testa y el cotiledón.
4. Si 4 de 5 granos poseen el aro en el borde del cotiledón, el proceso ha finalizado.

Prueba de la vacuola

1. Seleccionar 10 granos de diferentes lugares del cajón de fermentación.
2. Cortar el grano en forma longitudinal y obtener 2 mitades.
3. Cubrir con glicerina una de las mitades del grano
4. Observar y comparar las dos mitades con la ayuda de una lupa
5. Determinar el porcentaje de vacuolas rotas
6. El resultado se expresa como el porcentaje de vacuolas rotas.

Nota: Una vacuola intacta se presenta como un punto violeta, una vacuola rota libera el material celular

Recursos:

1. Cajones de fermentación
2. Hojas de banano
3. Sacos de yute
4. Potenciómetro
5. Termómetro
6. Humidímetro digital
7. Navaja
8. Balanza
9. Matraz Erlenmeyer

está realizando un correcto proceso, como la **Prueba del aro de café, Prueba de la vacuola.**

10. Glicerina

11. Lupa

Sección 3| DOCUMENTACIÓN

Formulario y registro de control:

- Registro para control de calidad durante la fermentación
- Registro de uso de recursos.

Sección 4| REFERENCIAS NORMATIVA

- Manual de Aplicabilidad de Buenas Prácticas Agrícolas para Cacao
- Política de Calidad de la empresa "Leyenda de chocolate"

Anexo 4

Código: P_0004	LEYENDA DEL CHOCOLATE	Versión: 1
Fecha implementación: Junio de 2016	PROCEDIMIENTO OPERATIVO ESTANDARIZADO Secado de granos de cacao Nacional	Página 58 de 2

Área: Planta de beneficio
Responsable: Trabajador agrícola
Nombre POE: Secado de granos de cacao Nacional

Ubicación:
Contacto:
Frecuencia: Diario

Sección 1 INFORMACIÓN GENERAL

Acciones iniciales

1. Asignar personal responsable del proceso de desgrane
2. Verificar el estado sanitario de las instalaciones en donde se realizará el procedimiento.
3. Verificar existencia de los recursos necesarios.

Recursos

1. Botas de caucho.
2. Overol.

Sección 2 PROCEDIMIENTOS

Procedimiento de secado de granos de cacao

4. Los granos de cacao son trasladados en una carretilla desde las cajas de fermentación hasta las marquesinas de secado.
5. Colocar los granos en las planchas de la marquesina, cuidando que no sobrepase de 3 cm de espesor la capa de cacao.
6. El primer día de secado permitir el contacto de los granos con rayos de sol únicamente por 2 horas, posteriormente se cubre la marquesina con plástico negro.
7. El segundo día de secado permitir el contacto de los granos con rayos de sol únicamente por 2 a 3 horas, posteriormente se cubre la marquesina con plástico negro.
8. El tercer día de secado permitir el contacto de los granos con rayos de sol únicamente por 3 a 4 horas, posteriormente se cubre la marquesina con plástico negro.
9. El cuarto día de secado permitir el contacto de los granos con rayos de sol únicamente por 4 a 6 horas, posteriormente se cubre la marquesina con plástico negro.
10. El quinto día de secado permitir el contacto de los granos con rayos de sol por todo el día.

Recursos

3. Marquesinas de secado.
4. Carretilla.
5. Pala metálica.
6. Removedor de madera tipo tridente.

Sección 3. DOCUMENTACIÓN

Formulario y registro de control:

1. Registro de control de ingreso a proceso de secado.
2. Registro de control de actividades de remoción de cacao.

Sección 4. REFERENCIAS NORMATIVA

Guía de buenas prácticas agrícolas para cacao Resolución Técnica No. 183.

REGISTRO DE INGRESO A PROCESO DE SECADO

Fecha	Nº de Lote	Hora	Peso	Observaciones	Responsable

Elaborado/Actualizado por :	Revisado por :	Aprobado por :
Nombre Cristina Daza, Esteban Tapia Cargo : Estudiante	Nombre Cargo : Coordinador agropecuario	Nombre Cargo : Jefe de producción
Fecha : 03 de noviembre de 2016	Fecha : 03 de noviembre de 2016	Fecha : 03 de noviembre de 2016

