



FACULTAD DE INGENIERÍA Y CIENCIAS APLICADAS

EVALUACION DE LEVADURAS EN EL PROCESO DE FERMENTACION
DE CACAO “NACIONAL” (*Theobroma cacao* L.) EN DOS REGIONES DEL
ECUADOR

AUTOR

DAVID ARTEMIO ALCIVAR BARAHONA

AÑO

2018



FACULTAD DE INGENIERÍA Y CIENCIAS APLICADAS

EVALUACION DE LEVADURAS EN EL PROCESO DE FERMENTACION DE
CACAO "NACIONAL" (*Theobroma cacao* L.) EN DOS REGIONES DEL
ECUADOR

"Trabajo de Titulación presentado en conformidad con los requisitos
establecidos para optar por el título de Ingeniero Agroindustrial y de Alimentos"

Profesora Guía
Ms. María Raquel Meléndez Jácome

Autor
David Artemio Alcívar Barahona

Año
2018

DECLARACIÓN DEL PROFESOR GUÍA

“Declaro haber dirigido este trabajo, Evaluar el efecto de levaduras presentes en la fermentación del Cacao “Nacional” (*Theobroma cacao* L.) En dos regiones del Ecuador, a través de reuniones periódicas con el estudiante David Artemio Alcívar Barahona, en el semestre 2018-2, 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 Fito farmacia
C.I.: 1709384067

DECLARACIÓN DEL PROFESOR CORRECTOR

“Declaro haber revisado este trabajo, Evaluar el efecto de levaduras presentes en la fermentación del Cacao “Nacional” (*Theobroma cacao* L.) En dos regiones del Ecuador, en el semestre 2018-2, dando cumplimiento a todas las disposiciones vigentes que regulan los Trabajos de Titulación”.

Viviana del Rocio Yáñez Mendizábal

Doctora en Ciencias y Tecnología Agraria y Alimentaria

C.I.: 1710469782

DECLARACIÓN DE AUTORÍA DEL ESTUDIANTE

“Declaro que este trabajo es original, de mi 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”.

David Artemio Alcívar Barahona
C.I.: 1718304320

AGRADECIMIENTOS

Le doy gracias a Dios quien me ha sabido guiar para poder concluir un capítulo más de mi vida, conjuntamente a mis padres que han sido un apoyo increíble en el trascurso de toda mi vida estudiantil, a mi hermano que nunca deja de salvarme la vida cuando más lo necesito a mi gran amigo, compañero y hermano Pablo Gaón que fue una de las personas que nunca dejo de apoyarme en todas las decisiones dándome los mejores consejos. De igual manera a República de Cacao en colaboración con COFINA, y a la empresa primavera oriental, por permitirme entrar a la planta, asesorarme y apoyarme a lo largo de la Tesis.

DEDICATORIA

A mis venerados Abuelitos Andrés y Mercedes por haber cuidado de mi toda mi infancia y brindarme todo el cariño y el amor que un niño necesita. A mis amados padres Ariosto y Carmen quien se sacrifican día a día para que sus hijos tengamos un mejor futuro por el amor, los consejos que hicieron

RESUMEN

El presente estudio estuvo enfocado a la tecnificación de procesamiento de fermentación en las localidades de Vinces provincia de Los Ríos en la empresa República de Cacao en Colaboración con COFINA y Shushufindi provincia Sucumbíos en la empresa PACARI. Para la tecnificación del proceso, en ambas empresas, se identificaron los microorganismos presentes en el proceso de fermentación de cacao en lotes de producción de las variedades “Nacional” y “Trinitario” clon CCN-51. Esto se da porque los procesos de fermentación son procesos realizados de manera empírica por los agricultores pertenecientes a cada localidad por lo cual no existe una certeza de los microorganismos que están presentes en el proceso de la fermentación, con lo cual da como resultado una alta variabilidad en el mercado del grano de cacao. Con el fin de estandarizar los procesos de calidad tanto en ambas variedades “Nacional” y “Trinitario” clon CCN-51 las dos empresas República de Cacao en colaboración con COFINA y Pacari decidieron investigar los microorganismos que están en mayor cantidad en el proceso de la fermentación. Los géneros que aparecieron en la zona de Vinces provincia de Los Ríos fueron *Saccharomyces cerevisiae* (37%), *Candida magnoliae* (45%) y *Candida krusei* (2.18%), mientras que, en la zona de Shushufindi, provincia de Sucumbíos, fueron *Saccharomyces cerevisiae* (16%), *Kloeckera* spp. (1%) y *Candida* spp. (83%), siendo la especie *Candida magnoliae* la de mayor presencia en ambas localidades. En base a estos resultados y con el fin de incrementar el índice de granos completamente fermentados se realizó un análisis para la determinación morfológicamente de los tipos de levaduras presentes en el proceso de fermentación mediante kit API. Una vez identificadas las levaduras de mayor prevalencia en ambas variedades se evaluó el efecto de un aislado de *Candida magnoliae* proveniente de las muestras de cacao “Nacional” y “Trinitario” clon CCN-51 comparado con *Saccharomyces cerevisiae* comercial y el testigo que no se realizó cambio alguno en la flora microbiana de fermentación. Los resultados demostraron que el índice de fermentación con el inóculo de *Candida magnoliae* en la variedad “Trinitario” clon CCN-51 fue de un 82%, mientras que

con la variedad "Nacional" fue 58%. En los análisis de la temperatura y pH durante la fermentación se obtuvo que en ambas variedades fue superior con el inóculo de *Candida magnoliae* en comparación a *Saccharomyces cerevisiae*. Por lo que los granos inoculados con *Candida magnolie* presentaron mejores resultados en la fermentación frente a los inoculados *Saccharomyces cerevisiae* y al testigo, siendo la variedad "Trinitario" clon CCN-51 la que presentó mayor índice de fermentación. De esta manera se concluye que la inoculación de *Saccharomyces cerevisiae* mejoró la efectividad en la fase de fermentación y que su identificación permitirá estandarizar la calidad del grano de cacao en las zonas estudiadas.

ABSTRACT

The present study was focused on the fermentation processing technification in the towns of Vinces province of Los Ríos in the Republic of Cacao Company and Shushufindi province of Sucumbíos in the PACARI Company. For the technification of the process, in both companies, the microorganisms present in the cocoa fermentation process were identified in production lots of the "National" and "Trinitario" varieties, clone CCN-51. This is because the fermentation processes are carried out empirically by the farmers belonging to each locality which is why there is no certainty regarding the microorganisms that are present in the fermentation process, which results in a high variability in the cocoa bean market. In order to standardize the quality processes in both "National" and "Trinitario" clone CCN-51 both companies, Republic of Cacao and Pacari decided to investigate the microorganisms that are in greater quantity in the fermentation process. The types that appeared in the area of Vinces province of Los Ríos were *Saccharomyces cerevisiae* (37%), *Candida magnoliae* (45%) and *Candida krusei* (2.18%), while, in the area of Shushufindi, province of Sucumbíos, were *Saccharomyces cerevisiae* (16%), *Kloeckera spp.* (1%) and *Candida spp.* (83%), being the *Candida magnoliae* species the one with the greatest presence in both locations. Based on these results and in order to increase the index of fully fermented grains, an analysis was performed in order to establish the morphological determination of the types of yeasts present in the fermentation process by API kit. Once the most prevalent yeasts were identified in both varieties, the effect of a *Candida magnoliae* isolate de the "National" and "Trinitario" cocoa samples clone CCN-51 compared with commercial *Saccharomyces cerevisiae* and the control that was not I make some change in the microbial flora of fermentation. The results showed that the fermentation index with the *Candida magnoliae* inoculum in the variety "Trinitario" clone CCN-51 was 82%, while with the National variety it was 58%. In the analysis of the temperature and pH during the fermentation it was obtained that in both varieties it was superior with the inoculum of *Candida magnolie* in comparison to *Saccharomyces cerevisiae*. Therefore, the grains inoculated with *Candida magnoliae* presented better results in the fermentation

in comparison with the grains inoculated with *Saccharomyces cerevisiae* and to the control, being the "Trinitario" variety clone CCN-51 the one with the highest fermentation index. In this way it is concluded that the inoculation of *Saccharomyces cerevisiae* improved the effectiveness in the fermentation phase and that its identification will allow to standardize the quality of the cocoa bean in the zones studied.

INDICE

1. CAPITULO I INTRODUCCIÓN	1
1.1. OBJETIVO	4
1.1.1. General	4
1.1.2. Objetivo específico.....	4
2. CAPITULO II MARCO TEÓRICO	4
2.1. Historia del cultivo del cacao	4
2.2. Descripción general del cultivo de cacao (<i>Theobroma cacao</i>)	6
2.2.1. Descripción taxonómica del cacao (<i>Theobroma cacao</i> L.).....	6
2.2.2. Variedades cultivadas.....	7
2.3. Manejo de pos cosecha de frutos de cacao.....	9
2.3.1. Cosecha del cacao	9
2.3.2. Fermentación.....	10
2.3.3. Proceso de secado para los granos de cacao.....	11
2.3.4. Características de la calidad del cacao	12
2.4. Bioquímica del proceso de fermentación del cacao.....	14
2.4.1. Levaduras presentes en la primera fase de fermentación.....	15
2.4.2. Levaduras presentes en la segunda fase de fermentación.....	16
2.4.3. Levaduras presentes en la tercera fase de fermentación.....	16
2.4.4. Levaduras presentes en la cuarta fase de fermentación	17
2.5. Rol de las levaduras en el proceso de la fermentación.....	17
3. CAPITULO II METODOLOGÍA	19
3.1. Materiales y Métodos	19
3.1.1. Zonas de muestreo	19
3.2. Estudio del proceso de fermentación mediado por levaduras	20
3.2.1. Determinación de tamaño de muestra.....	20
3.2.2. Muestreo de levaduras en depósitos de fermentación.....	21
3.2.3. Identificación y cuantificación de levaduras	23
3.2.4. Evaluación de levaduras comerciales y nativas en mejora de la fermentación	24
3.2.5. Determinación del índice de fermentación	25

4.	CAPITULO IV RESULTADOS Y DISCUSIÓN	27
4.1.	Determinación del tamaño de muestra	27
4.2.	Identificación bioquímica de levaduras con mayor prevalencia en los granos de cacao durante el proceso de fermentación.....	27
4.3.	Factores abióticos circundantes durante el proceso de fermentación.....	28
4.4.	Cuantificación de levaduras presentes en la fermentación de cacao.....	31
4.5.	Ensayo de la influencia inoculantes de levaduras en el proceso de fermentación	33
4.6.	Promedios de pH evaluados en el proceso de fermentación en la variedad “Nacional” y “Trinitario” clon CCN51	38
4.7.	Índice de Fermentación en las Variedades “Nacional” y “Trinitario” clon CCN51	41
5.	CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	44
5.1.	Conclusiones.....	44
5.2.	Recomendaciones.....	45
	REFERENCIAS.....	48

1. CAPITULO I INTRODUCCIÓN

El cacao ecuatoriano tiene un alto índice de demanda en la industria mundial de chocolate, destacado principalmente por su aroma y sabor frutal y floral que lo diferencia de los demás cacos del mundo. Estas características se determinan por elementos edafoclimáticos, genotipo y métodos de procesamiento de pos-cosecha del grano de cacao (Schwan, y Wheals, 2004, pp. 205-221). Según estadísticas del Banco Central del Ecuador, a finales del año 2012, el cacao, el banano, las flores y el camarón, representaron los primeros cuatro puestos de los productos agrícolas con mayor índice de exportación (Banco Central del Ecuador, 2017). En los últimos años las exportaciones del grano, así como la producción ha tenido un crecimiento anual del 10% (Enriquez, 1985, pp. 40-60). El volumen de exportación fluctúa alrededor de 235000 toneladas métricas al año, ubicándose en el quinto puesto de productores mundiales de cacao luego de Nigeria, Indonesia, Ghana y Costa de Marfil. Según datos de 2011 las producciones de cacao alcanzaron cerca de 260.000 toneladas, lo cual le generó al país 850 millones de dólares (Paz y Cepeda , 2011, pp. 1-10).

En el país, se producen diferentes variedades junto con materiales clonales desarrollados principalmente por el INIAP, la más conocida es la variedad Cacao “Nacional” y es catalogada en la industria chocolatera como Cacao Fino de Aroma. Este es un grano de cacao que se distingue del resto por sus características organolépticas de calidad y su corto tiempo de fermentación (Schwan y Wheals, 2004, pp 205-221). En el año de 1956 se desarrolló en el país una variedad conocida como “Trinitario” clon CCN-51 (Colección Castro Naranjal) que, a diferencia de la variedad “Nacional”, posee una resistencia a enfermedades como monilia y escoba de bruja. Además, su índice de productividad es más alto que la variedad “Nacional”. Esto causó que la producción de cacao “Trinitario” clon CCN-51 aumentara entre los productores y generó una reducción del cultivo de la variedad “Nacional” en el país (INIAP, 2012).

Dentro del procesamiento del grano de cacao, la fermentación toma un papel clave en la calidad final del grano. Durante el proceso intervienen diferentes grupos de microorganismos que interactúan con la materia vegetal y los factores circundantes otorgando al grano características organolépticas (sabor y aroma) (Ohene, Quao, Simpson, Takrama, & Kwesi, 2011, pp. 755-764). De acuerdo a Ostovar y Keeney (1973) en la primera fase (24 Horas) de la fermentación, son las levaduras las que se encargan del proceso de la fermentación. Según investigaciones y estudios de la última década se ha llegado a la conclusión de que para mejorar las características organolépticas de los granos de cacao es necesaria la proliferación de las levaduras para mejorar la calidad del proceso de fermentación (Ho, Zhao y Fleet, 2014, pp. 72-87). Durante la segunda fase (48 Horas) hay mayor presencia de bacterias ácido lácticas y finalmente, en la tercera y cuarta fase de la fermentación hay más proliferación de bacterias ácido acéticas (Ho, Zhao, y Fleet, 2014, pp 72-87).

Cada uno de los microorganismos mencionados interviene en la fermentación del grano de cacao de forma distinta. Las levaduras juegan varios roles en la producción de grano de cacao. Inician una fermentación alcohólica de los azúcares de la pulpa para producir etanol y dióxido de carbono. El etanol contribuye a matar el grano, así como ser un sustrato para la producción de ácido acético por parte de la bacteria del ácido acético (Fowler, 2009, pp. 50-70). Las bacterias ácido lácticas por su parte actúan fermentando los azúcares de la pulpa, lo que lleva a la producción principalmente de ácido láctico y ácido acético, que acidifican al grano, disminuyendo el pH de 7.0 a 5.0, lo que permite el desarrollo de las actividades enzimáticas (por ejemplo, proteasa, invertasa y glicosidasa) dentro del grano que conducen a la generación de precursores de sabor (Hansen, del Olmo, & Burri, 1998, pp. 273-281). Por otra parte, las bacterias ácido acéticas actúan metabolizando el etanol, inicialmente producido a partir de actividades de levadura, en ácido acético, que es el agente principal que provoca la muerte del grano. Esta muerte y la descomposición de la organización celular dentro del grano desencadenan una

serie de reacciones bioquímicas endógenas que dan los precursores del sabor y el color del chocolate (Afoakwa, Paterson, Fowler, & Ryan, 2008, pp. 840-857). También puede hacer contribuciones de bacterias *Bacillus* en la que se ha encontrado que producen un conjunto de enzimas degradantes de lípidos, proteínas y polisacáridos extracelulares (Ardhana M; Fleet G, 2009, pp. 87-89), todas las cuales están relacionados con producción de olores desagradables al grano. Finalmente se encontrado contribuciones de hongos filamentosos, que están relacionados con la producción de sabores de deterioro y la producción de micotoxinas, principalmente ocratoxina A y aflatoxinas (Sánchez et al., 2008, pp. 336-340).

Tal es la importancia de la fermentación en calidad de grano que, en 1993, el valor del cacao Ecuatoriano descendió drásticamente debido a una sanción impuesta por la Asociación Internacional” de Cacao (ICCO) debido a la baja calidad de los granos de cacao relacionada con procesos de fermentación y otros aspectos como el manejo postcosecha y el proceso de secado, ya que no existía ningún tipo de control de calidad y estandarización que se llevaban a cabo en esos años (Bernal, 2007, pp. 18-19).

En el Ecuador el proceso de fermentación del grano se realiza aun de manera rústica, mediante el conocimiento empírico de cada productor, por lo que se obtienen granos de calidad muy variable, además que también ocasiona pérdidas, más del 30% de los granos de cacao cosechados se pierden debido a un mal proceso de fermentación (Quiroz, 1994, pp. 365-387). Esto ha ocasionado que algunos agricultores han optado por abandonar la producción de cacao y optar por cultivos que otorguen mayor rentabilidad como el maíz, el banano y el café.

En las localidades de la empresa Republica de Cacao en Colaboración con COFINA (Vinces, Provincia de Los Ríos) y la empresa Primavera Oriental (Shushufindi, Provincia de Sucumbíos), el problema de estandarización se encuentra con frecuencia entre los productores nacionales de cacao. En ambas

localizaciones, el cacao se lo obtiene de varios productores independientes de cada lugar. En ambas provincias existen 26 comunidades que se dedican a la producción de cacao, con un total de 1000 agricultores quienes, al verse afectados por la sistematización de grandes productores. Esta diversificación de materia prima ocasiona que no se pueda estandarizar las características organolépticas en general por la forma empírica que tiene cada productor para procesar el cacao en pos cosecha.

Es por ello la importancia de la identificación de los microorganismos presentes en la fermentación del grano de cacao, especialmente de las levaduras, debido a que son el microorganismo principal que interviene en este proceso. La identificación de las mismas es un gran aporte para la estandarización de las características organolépticas del grano de cacao, permitiendo el desarrollo de fermentaciones controladas. Por lo que su capacidad podría ser usada para mejorar las características sensoriales de los granos de cacao y la calidad del chocolate ecuatoriano.

1.1. OBJETIVO

1.1.1. General

Evaluar el efecto de levaduras presentes en la fermentación del cacao “Nacional” y “Trinitario” clon CCN-51 (*Theobroma cacao*) en dos regiones del Ecuador.

1.1.2. Objetivo específico

Identificar las levaduras de mayor prevalencia en el cacao “Nacional” y “Trinitario” clon CCN-51 en baba de la provincia de Sucumbíos y Los Ríos.

Evaluar el efecto de las levaduras en la fermentación del cacao “Nacional” y “Trinitario” clon CCN-51 en las provincias de Sucumbíos y Los Ríos.

2. CAPITULO II MARCO TEÓRICO

2.1. Historia del cultivo del cacao

En Ecuador durante el siglo XVI la comercialización del cacao estuvo en auge en las costas de río Daule y Babahoyo, esto llamó la atención de agricultores guayaquileños, quienes empezaron a desarrollar pequeñas plantaciones de cacao a lo largo de las orillas del río Guayas (Paz y Cepeda , 2011, pp. 1-10). Estas plantaciones se extendieron por los ríos Daule y Babahoyo, en dirección opuesta a la corriente del río, por lo cual se lo denominó: “Variedad Arriba”, nombre por el que se le conoce en el extranjero. Este cacao también es conocido como Cacao “Nacional” (Paz y Cepeda , 2011, pp. 1-10). Entre los años 1800 y 1822, la exportación del grano representaba entre el 40 y el 60% del total de las exportaciones del país; este rubro pagaba el 68% de los impuestos de la nación (Paz y Cepeda , 2011, pp. 1-10). Las áreas históricamente cultivadas y adaptadas para el cultivo de cacao fueron la provincia de los Ríos, parte de la provincia del Guayas y la provincia de El Oro, en las cuales existían explotación por mano de obra barata provenientes de la Sierra y Costa del país y las características edafológicas y climáticas permitían un mayor desarrollo del cultivo (Paz y Cepeda , 2011, pp 1-10). Hoy en día el cacao constituye un producto primario de exportación, que impulsa la economía del país, definiéndolo como cultivo promisorio de consumo masivo (Enriquez, 1985, pp. 260-280).

En la actualidad la cosecha mundial de cacao se concentra el 70% en África, Costa de marfil es el punto de mayor producción, Asia ocupa el segundo puesto con 17% y América con 13%. El crecimiento anual de la producción de cacao ha superado los 3.6 millones de toneladas métricas para américa, lo que representa un crecimiento anual del 2 al 2.5% (Compañía nacional de chocolates S.A.S, 2012, pp. 2-8).

En cuanto a su origen, desde la época de la colonia española alrededor del siglo XV, se pensó que el cacao era nativo de Centroamérica: México, Guatemala, y Honduras. Sin embargo, estudios recientes revelan que las variedades de cacao fueron llevadas y domesticadas por culturas como la Maya desde la alta Amazonia (Enriquez, 1985, pp. 260-280). De América llego

a Europa gracias a los españoles, su producción fue creciendo rápidamente y se siguió expandiendo hasta llegar a las Islas Caribe, Asia, Oceanía y África. Ahora África es el mayor productor de cacao, debido a que el ecosistema ha permitido un favorable desarrollo del cultivo (Federación Nacional de Cacaoteros, 2003, pp. 45-60)

2.2. Descripción general del cultivo de cacao (*Theobroma cacao*)

2.2.1. Descripción taxonómica del cacao (*Theobroma cacao* L.)

El cacao pertenece al reino vegetal, *Magnoliophyta*, a la clase *Magnoliopsida*, del orden de *las Malvales*, y familia *Malvaceae* (Batista, 2009, pp. 60-92). La planta de cacao presenta una raíz pivotante que puede medir entre 1.10 metros y 1.60 metros de profundidad y horizontalmente la raíz se desarrolla entre los 20 y 25 centímetros (Batista, 2009, pp. 60-92).

El tallo puede llegar a medir entre 1.50 y 2.30 metros de altura en un lapso de 1 a 1.6 años de edad. El tronco presenta un total de 3 a 6 ramillas llamadas verticilos (Batista, 2009, pp. 60-92). Las hojas son coriáceas; su estructura madura presenta un color verde con una forma lanceolada y una nervadura pinnada. Las hojas de cacao miden entre 10 y 50 centímetros de largo; 5 y 20 centímetros de ancho. Son oblongas y glabras (Batista, 2009, pp. 60-92).

La flor de cacao es cauliflora, hermafrodita, de color blanco, púrpura y rosa y presenta de un tamaño entre 0.5 a 1 cm. de diámetro en forma de estrella con 5 pétalos, 5 sépalos y 5 estambres, es por lo tanto una flor pentámera. El pedúnculo floral mide entre 1 y 4 cm de largo (Spichinger, 1990, pp. 100-115).

La polinización de las flores es entomófila, lo que quiere decir que la apertura del botón floral inicia a horas de la tarde, con el fraccionamiento de su estructura y en la mañana su flor está totalmente abierta por un periodo de viabilidad de 2 días para la polinización (Chavez, Tuxill, & Jarvis, 2004, pp. 202-222).

El fruto del cacao es una mazorca de 20 cm de largo y 10 cm de ancho. El tamaño depende de la especie. Esta mazorca está formada por exocarpio, mesocarpio y endocarpio y contiene alrededor de 20 a 40 semillas por fruto. En casos excepcionales alcanza 50 semillas, dependiendo del tamaño del fruto. Las almendras se encuentran incrustadas en mucilago de color blanco y presentan diferentes formas: ovoide, alargada, puntiaguda y estrecha o prácticamente esférica (Batista, 2009, pp. 60-92).

La semilla mide de 2 a 3 cm; se encuentra recubierta por una pulpa llamada mucílago, el peso del grano varía según la variedad, pero oscila entre 2 y 3.5 gr en promedio (Chavez, Tuxill, y Jarvis, 2004, pp. 202-222).

2.2.2. Variedades cultivadas

En el país se cultivan diversas variedades de cacao, pero el más conocido se denomina “Nacional” que, por sus características de sabor, aromas frutales, florales, nueces y malta; tiene mucha demanda en la industria chocolatera mundial (Enriquez, 1985, pp. 136-145). Las otras variedades más cultivadas tienes que citar Trinitarios y forasteros según la región.

La calidad que el cacao presenta al final del proceso de pos cosecha, es el resultado de una buena fermentación. Las características óptimas del grano de cacao para la industria chocolatera dependen en gran parte del manejo del cultivo (Batista, 2009, pp. 60-92).

Las características que posee el cacao “Nacional” o variedad arriba son muy apreciadas por la industria que se dedica a la fabricación de chocolate en todo el mundo. Ecuador se caracteriza por ser uno de los principales países exportadores de cacao de tipo “Nacional” (Enriquez, 2010, pp. 2-11).

La aparición de severas enfermedades como: moniliasis, monilia o monilla (causado por *Moniliophthora roreri* o *Crinipellis roreri*) y la escoba de bruja

(causada por *Crinipellis perniciosa*), desde la década de los 70 merman la producción causando pérdidas significativas, (Quiroz, 1994, pp. 35-46). Esto provocó la importación masiva de cacao de Venezuela. Este hecho hizo que la calidad y aroma del grano disminuyera al mezclarse las variedades de los dos países, dando como resultado plantas híbridas productivas y tolerante a las enfermedades (Quiroz, 1994, pp. 35-46). Actualmente, existen 521.000 ha cultivadas de cacao en el Ecuador y el país es reconocido como el primer productor de cacao de calidad “Nacional” fino de aroma (Cordero, 2003, pp. 234-246).

Las variedades de cacao tradicionalmente se clasifican en criollo, forastero y trinitario (Dostert, Roque, Cano, La Torre, & Weigend, 2017). Sin embargo, las variedades que hoy están cultivadas alrededor del mundo son híbridos, por lo que las plantas cultivadas no siempre pueden ser catalogadas dentro de esta clasificación clásica (Dostert, Roque, Cano, La Torre, y Weigend, 2017).

La variedad criolla tiene como característica frutos de cubierta delgada, con una coloración rojiza o amarilla en la parte del exocarpio. La semilla es de forma redonda, presenta bajo rendimiento y una mayor susceptibilidad a las enfermedades y plagas (Batista, 2009, pp. 60-92).

La variedad forastera tiene como características una tonalidad verde en su mazorca, el pericarpio de una densidad mayor a la variedad criollo, las semillas aplanadas y forma redondeada. Esta variedad representa un 80% de la producción mundial (Dostert, Roque, Cano, La Torre, y Weigend, 2017).

La variedad “Trinitario” es un híbrido de la variedad Forastero x Criollo. Las plantas de la variedad “Trinitario” son robustas, los frutos son verdes, con pigmentación a su alrededor de color marrón. El color de las semillas puede ser violeta o colores opacos. Cabe recalcar que el 15 % de la producción mundial es de una fuente de cacao “Trinitario” (Dostert, Roque, Cano, La Torre, y Weigend, 2017).

A pesar de estas clasificaciones tradicionales, en Ecuador existe un cacao que sale de esta clasificación ya que es único en el mundo y se le conoce como “Cacao Fino de Aroma” o “Cacao “Nacional””, reconocido internacionalmente por su sabor, aromas frutales, florales, de nueces y malta (IICA, 2017).

Estudios tanto morfológicos como de ADN han logrado demostrar que el Cacao “Nacional” no pertenece a la clasificación Forastero ya que anteriormente se lo clasificaba de esa manera por la semejanza de su fruto (Enriquez, 2010, pp. 2-11). En la actualidad, en Ecuador la mayoría de sembríos de cacao pertenece a la variedad “Nacional” x Forastero y también se encuentra “Nacional” x Trinitario (Enriquez, 2010, pp. 2-11).

Se puede decir que solo el 5% es Cacao “Nacional” puro y representa un total de 25 a 30.000 hectáreas sembradas, las cuales se ubican en las provincias de Guayas y Sucumbíos (Enriquez, 2010, pp. 2-11).

2.3. Manejo de pos cosecha de frutos de cacao

Una vez terminado el proceso de cosecha existen tres actividades fundamentales que otorgan calidad al cacao: la primera de ellas es la forma de extracción del contenido de las drupas o mazorcas. El segundo es el proceso de fermentación de los granos y finalmente el proceso de secado (Dostert, Roque, Cano, La Torre, y Weigend, 2017). Los procesos de pos cosecha no controlados dan como resultado granos no fermentados y otros fermentados parcialmente, además de una pérdida de materia prima del 25% del cacao puesto a fermentar (IICA, 2017).

2.3.1. Cosecha del cacao

Se conoce que una vez la mazorca se abre y se retiran las semillas del fruto, estas son susceptibles a los microorganismos del ambiente (Loli y Caverro, 2011). Por esto, un proceso importante de pos cosecha es la apertura del grano que se debe llevar a cabo en el mismo lugar donde fue cortada la

mazorca para obtener aromas característicos (Dostert, Roque, Cano, La Torre, y Weigend, 2017). A este respecto pre-secado mejora la calidad sensorial en la variedad “Trinitario” clon CCN-51, obteniendo granos con baja acidez, astringencia y amargor, característica que dan como resultado granos con nivel de fermentación óptima.

La forma de cómo se realiza los procesos depende de la localidad, el clima y el suelo; por lo que es muy distinta entre agricultores, ya que en los procesos de pos cosecha es donde se forman los aromas importantes y el contenido de polifenoles (Dostert, Roque, Cano, La Torre, y Weigend, 2017).

2.3.2. Fermentación

La fermentación es un proceso químico que tiene como finalidad diezmar el residuo de la pulpa que mantiene el grano de cacao eliminando el germen que se encuentra en la parte interior del grano (Lutheran World Relief, 2013). Para la industria chocolatera, la fermentación es un proceso esencial para que el grano de cacao genere el sabor, aroma y color requeridos para obtener una materia prima de calidad (Lutheran World Relief, 2013).

En el país los métodos de fermentación más relevantes son la fermentación en montón, la fermentación en sacos, y la fermentación en cajones. La fermentación en montón se realiza aglomerando el cacao en un secadero de piedra, madera o caña, para que se separe la baba del cacao, para mantener el calor interno de la muestra se cubre el cacao con hojas generalmente de plátano o banano. La fermentación en sacos por su parte se realiza colocando los granos de cacao en costales de yute cubriendo con hojas de banano para lograr el calor necesario en la masa. Sin embargo, este método no es muy eficaz, ya que no se puede realizar el volteo de los granos. Finalmente, la fermentación en cajones es el método es el más conocido para la fermentación del cacao. Se recomienda que las cajas tengan una medida de 90cm de fondo, de alto, y de largo por igual. Los cajones se construyen en madera de preferencia laurel (*Laurus nobilis*), pechiche (*Minquartia guianensis*) o

Guayacán (*Tabebuia chrysantha*). Las estructuras deben contar con paredes removibles para permitir los volteos y en el fondo del cajón debe haber aberturas a 10cm de distancia de cada una, para el drenaje de líquidos durante la fermentación (Agropecuarios, 2008).

Estos cajones deben estar separados del suelo por patas de 15cm, para que no estén en contacto con el suelo. De la misma forma que en los anteriores métodos, se cubre al cacao con hojas de banano para mantener el calor. Se recomienda que se realice en escalera para de esta manera facilitar el volteo cada 24 horas. Al verter el contenido de un cajón al nivel inferior, este proceso de fermentación se extiende entre 5 a 6 días, dependiendo de la variedad de cacao (Agropecuarios, 2008).

2.3.3. Proceso de secado para los granos de cacao

El proceso de secado se realiza con el fin de reducir la humedad del grano inicial partiendo de 50% hasta menos del 7 % (Lutheran World Relief, 2013). Los granos de cacao se extienden sobre tablados de madera dentro de los túneles de secado y la capa resultante no debe ser superior a 5cm de grosor (Lutheran World Relief, 2013).

Para que se logre evaporar el agua de la cubierta del cacao, se debe dejar 3 horas al calor natural del sol de la mañana durante las primeras 48 horas. A partir de las 72 horas se aumenta el tiempo de exposición un par de horas. Pasando el cuarto día, se le puede dar una exposición continua al sol para alcanzar menos del 7% de humedad deseado. Para que la distribución de calor sea uniforme, se debe mezclar o remover los granos de cacao cada cierto tiempo para llegar a un mejor resultado (Lutheran World Relief, 2013).

Para el proceso de secado se puede utilizar los métodos enunciados a continuación (Fundesyram, 2006):

- Secado artificial. - consiste en silos adecuados, para tener una relación entre la humedad relativa y la temperatura de secante.

- Secado natural. – en el que se utiliza la fuente de calor natural: el sol. Se utilizan mesas de madera, túneles de secado

Una gran diferencia entre los métodos de secado es la disminución del porcentaje de acidez en los granos secados por forma natural, a diferencia de los granos secados de forma artificial en un horno con una temperatura de 60°C los cuales tienen mayor porcentaje de acidez. (Irie, y otros, 2010, pp. 184-190). En esta fase, se debe impedir las contaminaciones cruzadas de medios externos como animales domésticos (Fundesyram, 2006).

A diferencia del secado artificial, cuya principal cualidad es un secado rápido, el secado natural proporciona un mejor resultado. Se debería de eliminar las prácticas comunes que utilizan las carreteras como mesa de secado, ya que tanto los metales pesados como las toxinas dentro del CO₂ que expulsan los automóviles que circulan por la carretera se pueden impregnar en el cacao y su sabor y su aroma (Agropecuarios, 2008).

2.3.4. Características de la calidad del cacao

La definición actual de “Calidad” se plantea como los requerimientos básicos para que un producto específico pueda ser aceptado en el mercado (Ohene, Quao, Simpson, Takrama, y Kwesi, 2011, pp. 210-223).

Para poder clasificar los granos de cacao se necesita realizar una prueba de corte e identificar el grado de fermentación en el que se encuentra además de un análisis organoléptico para poder clasificar de la siguiente manera (Ortiz, Graziani, y Rovedas, 2009, pp. 76-98):

- Almendras marrones con bordes violetas.
- Almendras de color café o marrón.
- Almendras pizarrosas.
- Almendras violetas.
- Almendras manchosas



Figura 1. Clasificación de Almendras secas de cacao por el grado de fermentación.

Tomado de: Rubio, 2009.

Entre las principales características de calidad del grano tenemos diferentes grupos de sabores:

Sabores específicos (Ohene, Quao, Simpson, Takrama, y Kwesi, 2011, pp. 210-223):

- Frutas maduras, como cacao seco y almacenado, frutas secas, uva
- Floral, con un sabor parcialmente perfumado, sabor a flores.
- Nuez, característico de los tipos Trinitarios y Criollos, licores con sabor a semillas de nuez.

Sabores básicos (Ortiz, Graziani, y Rovedas, 2009, pp. 76-98).

- Amargo, es un sabor característico que se percibe en el paladar posterior y la garganta, como ejemplo café negro, cerveza, aspirina.
- Acido, percibido fugazmente en el paladar medio y en los laterales de la lengua, produce abundante secreción de saliva, como ejemplo jugos cítricos, vinagre.
- Dulce, se percibe en la punta de la lengua, como ejemplo, panela, azúcar.

- Salado, se percibe en el lateral de la lengua, genera moderada salivación, generado por iones solubles presentes en el cloruro de sodio, o sal común.
- Astringente, sabor que produce contracción de la superficie de la mucosa bucal, en la lengua principalmente se produce una sensación áspera y seca, como ejemplo, el té, el plátano verde.

Durante el proceso de fermentación, el secado y el proceso de tostado, se genera la calidad aromática final (Cros, Mermet, Jeanjean, y Georges, 1994, pp 45-65). Se presentan tres tipos de fracciones determinadas en la calidad del aroma, en el grano de cacao fresco se presenta la fracción constitutiva, la fracción desarrollada en el proceso de la fermentación y el secado y una fracción final al momento del tostado del grano (Cros, Mermet, Jeanjean, y Georges, 1994, pp 98-112).

La calidad del aroma del cacao se forma desde que se produce la muerte del embrión, durante la acelerada destrucción de las antocianinas. Esto le proporciona al grano la calidad en sabor y aroma propio del chocolate (Braudeau, 1970, pp 78-86).

2.4. Bioquímica del proceso de fermentación del cacao

Durante el proceso de la fermentación se presentan dos tipos de fenómenos principales:

- a) En el mucílago, se presentan actividades microbianas, que producen alcohol, ácidos, y una generación de calor.
- b) Internamente en los cotiledones se presentan reacciones bioquímicas más complejas producidas por el metabolismo de los microorganismos en la pulpa (Minifie, 1989, p. 104).

En los primeros estudios sobre la contribución de las levaduras a la fermentación del grano de cacao se concluyó, que las levaduras son los principales organismos de fermentación (Roelofsen, 1958 y Rombouts, 1952, p. 423), las cuales transforman azúcares en etanol, mientras degradan la pectina y modifican la textura del grano. Estos microorganismos disminuyen la

concentración de acidez eliminando el ácido cítrico, en el proceso generan un entorno anaerobio, y favoreciendo el crecimiento de bacterias lácticas (Wacher, 2011). Además, como ya se mencionó anteriormente existen otros microorganismos que producen algunos compuestos que pueden alterar de manera positiva o negativa las características organolépticas del grano de cacao, como son las bacterias ácido lácticas, bacterias acéticas, bacterias *Bacillus* y hongos filamentosos (Hansen et al., 1998, pp. 213-235).

2.4.1. Levaduras presentes en la primera fase de fermentación

Según Bedoussac, Journet, Hauggaard, y Corre (2007) en el proceso de la fermentación se identifican las fases enunciada a continuación:

En esta fase mediante un estudio realizado en Brasil por Schwan, Rose y Board (1995) se han identificado entre 5 y 6 especies de levaduras. La especie más predominante en las primeras 24 horas es *Hanseniaspora guilliermondii*. Desde la aparición de las técnicas de biología molecular se ha identificado otra levadura, *Candida zemplinina*. En fermentaciones en charolas las levaduras más comunes suelen ser: *Candida silvae*, *Candida diversa* y *Candida zemplinina*. Se presume que esto se debe a una concentración elevada de oxígeno durante la fermentación. Al final de la primera fase, es decir entre las 36-38 horas se presentan levaduras como *Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia membranaefaciens* y *Candida krusei* (Schwan R, Rose A y Board R, 1995, pp. 96-107).

En Ghana, uno de los principales productores de cacao, se encuentran las siguientes levaduras: *Saccharomyces cerevisiae*, *Hanseniaspora opuntiae* y *Pichia kudriavzevii*. Debido a sus características metabólicas y al tipo de pH que posee la *Hanseniaspora opuntiae* se encuentra desde el inicio de la fermentación (Daniel, y otros, 2009, pp. 774-783).

En estudios recientes realizados por, Nielsen, Yoon, Yuan, Kristala, y Prather, (2010). Se identificaron levaduras nuevas como: *Geotrichum ghanense*,

Candida awuuii y *Candida halmiae*, que no se han registrado en otros ecosistemas o en su defecto fueron aislados especialmente del cacao.

2.4.2. Levaduras presentes en la segunda fase de fermentación

En esta fase, el desarrollo de bacterias lácticas es favorable. Estos microorganismos se encargan de fermentar los residuos de carbohidratos y de consumir el ácido cítrico. En un estudio realizado en Londres por Lahtinen (2010), se observó durante la fermentación, bacterias del tipo *Lactobacillus* (*L. mali*, *L. collonides*, *L. plantarum*, *L. fermentum*); del mismo modo se identificaron las especies: *Leucosotoc pseudoficulneum*, *Pedicoccus acidilactici* y *Leuconostoc pseudomesenteroides*. En Ghana se identificó una cepa nueva de *Weissella fabria*.

Para que se produzca la hidrolización de las pectinas; generando una reducción de la densidad del mucílago del grano de cacao, lo que favorece el ingreso del aire. Las bacterias acéticas se desarrollan de mejor manera en el ambiente aerobio y bajo en ácido, ya que se consumió en gran mayoría el ácido cítrico (Wacher, 2011).

2.4.3. Levaduras presentes en la tercera fase de fermentación

En el año 2007 Hauggaard-Nielsen (Dinamarca), identificó un cambio en los microorganismos que intervienen en la fermentación del cacao dado que las bacterias acéticas son las encargadas de transformar el etanol en ácido acético. Durante el proceso se produce calor, dado que es una reacción exotérmica (Thomsen, Hauggaard-Nielsen, Petersson, y Thomsen, 2007, pp. 214-234).

Para identificar la muerte del embrión del cacao se necesita tanto del etanol como del ácido acético junto con temperaturas altas. En un estudio realizado en Bélgica por Cleenwerck en 2008, se demostró que durante esta fase de la

fermentación, las bacterias acéticas más preponderantes eran: *Acectobacter aceti*, *Gluconobacter oxydans*, *Acectobacter syzgjii* y *Acectobacter pasteurianus*. Al final del proceso se detectó el *Acectobacter tropicales*. En Ghana se aisló una especie de levadura distinta en el proceso de fermentación denominada *Acectobacter fabarum* (Cleenwerck, y otros, 2008, pp. 310-324).

2.4.4. Levaduras presentes en la cuarta fase de fermentación

La cuarta es la última fase de la fermentación y generalmente dura entre 48 y 60 horas. En un estudio realizado en Indonesia por Ardhana (2009) durante esta fase se detectaron bacterias del género *Bacillus*: *B. megaterium*, *B. licheniformis*, *B. subtilis*, *B. pumilus*. Estas bacterias son conocidas por producir gran variedad de enzimas cuyas reacciones generan al cacao sabores y olores desagradables. Bacterias como las proteolíticas, actúan sobre las proteínas y las lipolíticas sobre las grasas, estas bacterias ayudan al sabor del cacao mediante la generación de saborizantes y ácidos orgánicos tales como 2,3-butanodiol (Ardhana y Fleet, 2009, pp 123-134).

En estudios de la fermentación del cacao realizados en Ghana y Brasil por Garcí-Armisen (2010), mediante métodos novedosos en base a biología molecular, se menciona por primera vez bacterias como: *Tatumella*, *Erwinia* y *Pantoea*. Estas bacterias no se habían detectado antes en ningún estudio, y aunque se han identificado como fitopatógenas, durante la fermentación pueden contribuir con el consumo del citrato modificando el pH de la mezcla final (García-Armisen P. H., 2010, pp. 2281-2292).

2.5. Rol de las levaduras en el proceso de la fermentación

Candida inconspicua es una especie de levadura que tiene como característica asimilar el ácido láctico, no producir etanol y no realizar ninguna actividad pectinolítica. Este microorganismo se encuentra presente en las primeras 24 horas de la fermentación (Lagunes y Gálvez, 2006, pp 134-146).

En cambio, la *Hanseniaspora guilliermondii* es una especie de levadura que tiene actividades pectinolíticas además de producir etanol, y se encuentra presente durante las 36 primeras horas del proceso de fermentación (Lagunes y Gálvez, 2006, pp 134-146).

Yarrowia lipolytica, *Pichia fermentans* y *Candida zeylanoides*, son especies de levaduras que tienen la capacidad de oxidar el ácido cítrico y tienen como característica producir etanol; exceptuando a la *Candida zeylanoides* (Lagunes-Gálvez, 2006). Por otra parte, *Hanseniaspora valbyensis* y *Candida krusei* son especies de levaduras que son capaces de oxidar el ácido cítrico y láctico; mientras que la *Candida glabrata* tiene la capacidad de producir etanol sin oxidar ácidos (Lagunes-Gálvez, 2006, pp 134-146).

El mucilago del cacao es rico en azúcar, lo que favorece el crecimiento acelerado de las levaduras. Una de las principales actividades de las levaduras es transformar la glucosa, sacarosa y fructosa en etanol y dióxido de carbono. (Forsyth y Quesnel, 1963, pp. 76-89). Otros resultantes de los procesos metabólicos de las levaduras fermentativas son la producción de los siguientes ácidos orgánicos débiles: acético, fosfórico, oxálico, málico y succínico que actúan como tampón para evitar fluctuaciones en el pH (Forsyth y Quesnel, 1963, pp. 76-89).

Candida spp., *Pichia* spp. Y otras levaduras son capaces de metabolizar el ácido cítrico, lo que hace que el valor del pH aumente en la pulpa y como resultante se da un incremento de bacterias, (Schwan y Wheals, 2004, pp. 213-234).

En consecuencia, la disminución de actividad y desarrollo de levaduras es resultado de la reducción de ácido cítrico, de los niveles elevados de alcohol e incremento de aireación (Schwan y Wheals, 2004, pp. 213-234). Las levaduras anteriormente nombradas, producen compuestos aromáticos, importantes para el desarrollo del sabor en el chocolate. Los principales compuestos aromáticos son ácidos grasos, alcoholes de fusel, y ésteres (Suomalainen y Lehtonen,

1979, pp. 126-135).

Entre las principales levaduras generadoras de compuestos aromáticos se pueden nombrar los siguientes géneros: *Kloeckera apiculata*, *Saccharomyces cerevisiae* variedad *Chevallieri*, Los compuestos aromáticos principales son: acetato de isopropilo, metanol, acetato de etilo, 1-propanol, 2,3-butanodiol, alcohol isoamilico, 2-feniletanol, y succinato de dietilo (Schwan y Wheals, 2004, pp. 112-143).

3. CAPITULO II METODOLOGÍA

3.1. Materiales y Métodos

Se seleccionó resultados científicos y comprobados (que se detallan en los siguientes párrafos) para utilizarlos como base en el desarrollo experimental de la metodología y su aplicación en las localidades de Vinces y Shushufindi.

3.1.1. Zonas de muestreo

La toma de muestras se realizó en dos localidades del Ecuador localizados en la provincia de Sucumbíos, en el recinto Primavera Oriental, cantón Shushufindi (Latitud -1.6°) (Figura 2). Esta zona se caracteriza por precipitaciones entre 1000 y 2000 mm anuales, humedad relativa anual promedio del 93% y temperatura entre 29 y 31 °C (Sigcha y Herrera, 2012, p. 210).

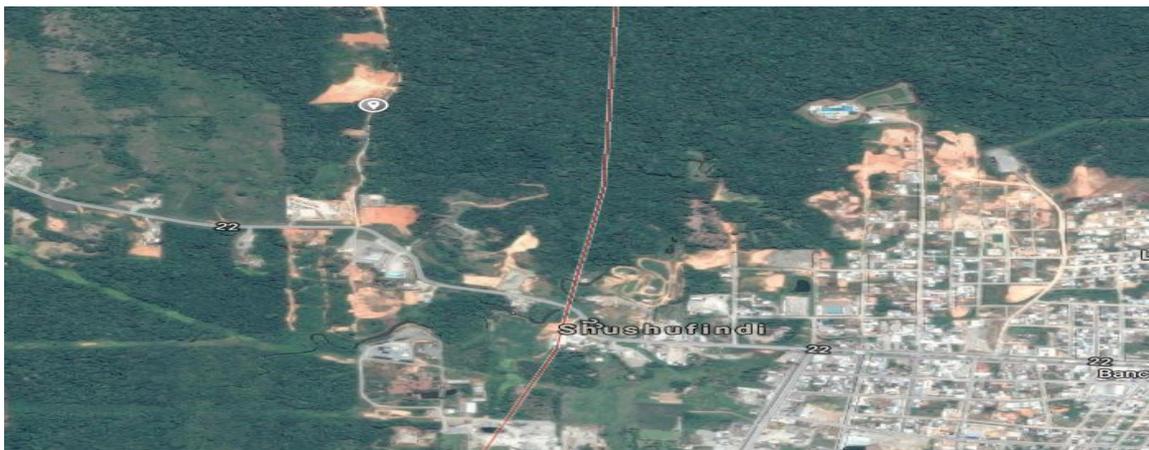


Figura 2. Se muestra la localidad del centro de acopio de la empresa, Primavera Oriental, Provincia de Sucumbíos: latitud 0.189795° ; longitud -76.636112° .

Tomado de Google Maps, 2017.

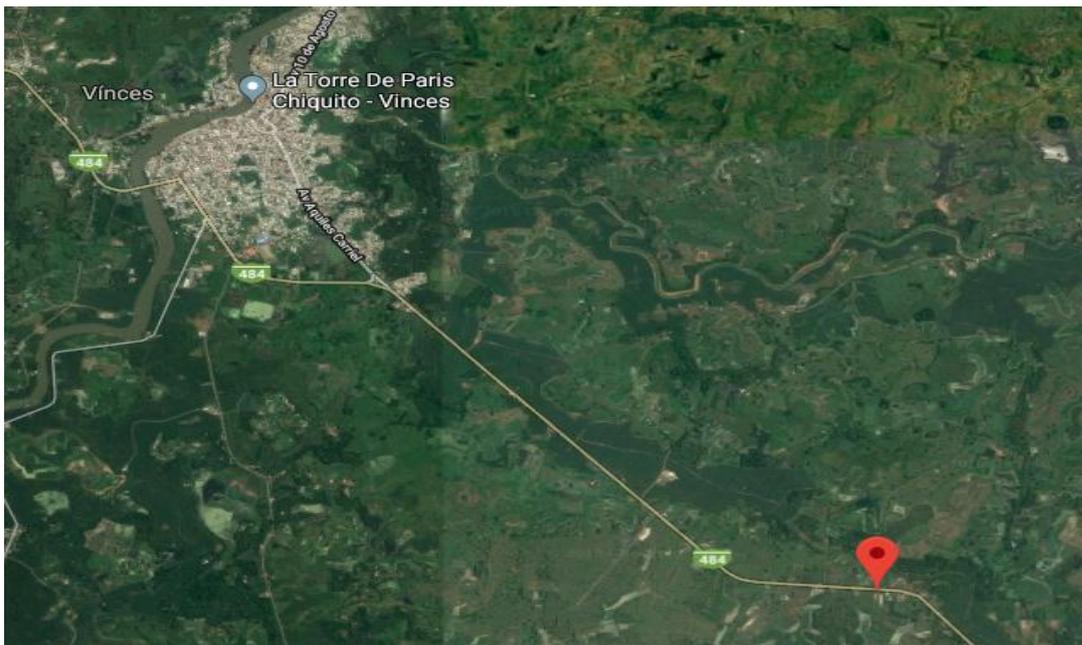


Figura 3. Localidad del centro de acopio de la empresa República del Cacao en Colaboración con COFINA, provincia de Los Ríos: latitud -1.60013° ; longitud -79.70812° .

Tomado de Google Maps, 2017.

El segundo lugar de muestreo se estableció al suroccidente de la provincia de Pichincha, en la estación de Republica de Cacao en Colaboración con COFINA; ubicado en la parroquia Antonio Sotomayor perteneciente al cantón Vínces, de la Provincia de Los Ríos (Figura 3). La precipitación anual oscila entre 1000 y 2500 mm anuales, su Humedad Relativa (HR) es de aproximadamente 98% y la temperatura promedio anual es de 27°C (Sigcha y Herrera, 2012, pp. 210-223).

3.2. Estudio del proceso de fermentación mediado por levaduras

3.2.1. Determinación de tamaño de muestra

Para determinar el tamaño de muestra se realizó un muestreo estratificado (como estratos se tomó a las variedades estudiadas), en donde el total del volumen de granos cosechados se dividió en grupos considerando dos variedades de cacao: “Nacional” y “Trinitario” clon CCN-51. Para esto se determinó el peso procesado semanalmente en el centro de acopio de Republica de Cacao en Colaboración con COFINA y en el centro de acopio de

Primavera Oriental. Una vez obtenidas estas cantidades, se determinó el tamaño de la muestra para cada una de las localidades. Se utilizó la fórmula tomada de Galindo (2006) que a continuación se la presenta en una ecuación 1. Se estableció un error del 10%, y un nivel de confianza del 95%.

Ecuación 1:

$$n = \frac{N \left(\frac{Z\alpha}{2}\right)^2 \sum_{i=1}^K N_i s_i^2}{E^2 N^2 + \left(\frac{Z\alpha}{2}\right)^2 \sum_{i=1}^K N_i S_i^2}$$

N: Total de población

N1: CCN51

N2: "Nacional"

S1"2": p*q proporción

S2"2": p*q proporción

Nivel de confianza: 95%

A: 5%

$\alpha/2$: 0.025

Z $\alpha/2$: 1.96

$\sum N_i * s_i^2$

Error: 10%

Figura 4. Ecuación de muestreo de población.
Tomado de Galindo, 2006.

3.2.2. Muestreo de levaduras en depósitos de fermentación

Para la toma de muestras en el centro de acopio Primavera Oriental, ubicado en Shushufindi, Provincia de Sucumbíos y para el recinto de la empresa Republica del Cacao en Colaboración con COFINA; se procedió a monitorear durante 12 horas, la temperatura de la masa de cacao de las dos variedades estudiadas. Se tomaron datos de temperatura cada dos horas en cada caja de fermentación con un termómetro (marca Multi- thermometer, modelo L-5000), calibrado entre 0 y 100° C a una profundidad de 7 cm en tres lugares diferentes de la masa de fermentación (superior, intermedia e inferior de la caja) para obtener un promedio de temperatura (como se muestra en la figura 5).

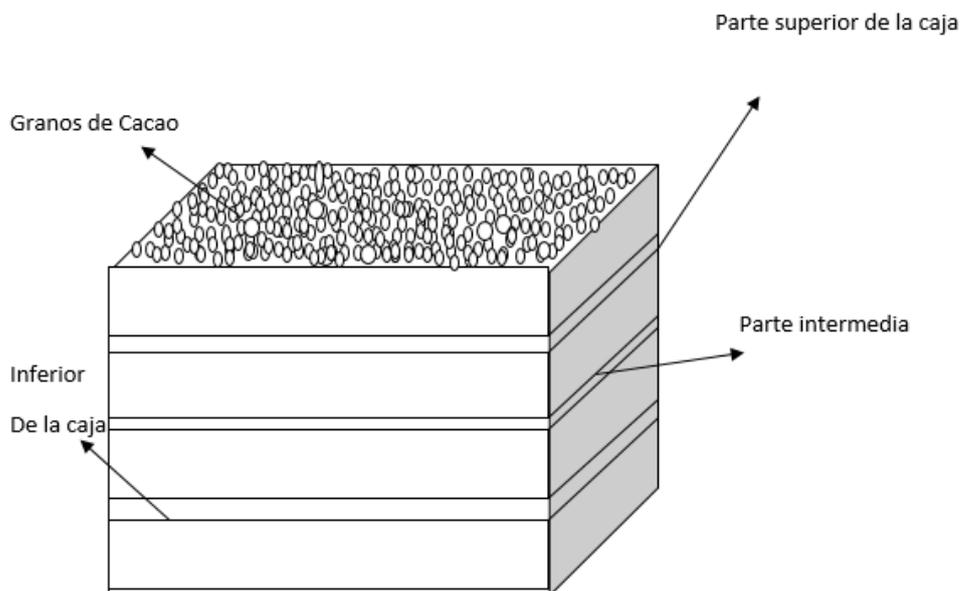


Figura 5. Esquema de la caja de fermentación y sistema de monitoreo de la temperatura y el pH.

Se tomaron datos de pH con un potenciómetro (marca Boeco y modelo PT-70) Para esto se realizó una mezcla de 20 g. de cacao en 100 ml de agua destilada.

En el recinto de primavera oriental, para el proceso de fermentación se utilizaron cajas de laurel de 1 m² con patas que separaron la caja 10 cm del suelo. Estos contenedores se llenan en su totalidad con granos de cacao para fermentar. La toma de muestra se inició a las 48 horas desde el comienzo del proceso de fermentación. (Camu N, De Winter T, Takrama J, Bernaet H y De Vyust L, 2007, pp. 1809-1824).

En el recinto de la empresa Republica del Cacao en Colaboración con COFINA, para el proceso de fermentación se utilizaron cajas de laurel de 1 m², con patas para separar la caja del suelo 10 cm. Estas cajas se llenaron con granos de cacao para fermentar.

En la localidad de Shushufindi, se recolectaron 69 muestras de cacao “Trinitario” clon CCN51 y 26 muestras de Cacao “Nacional”, para un total de 95

muestras. En la localidad de Vinces se procedió a tomar 85 muestras de cacao “Trinitario” clon CCN51 y 11 de Cacao “Nacional”, para obtener un total de 96 muestras. Se utilizaron bolsas estériles (Intercience) y guantes estériles. Las muestras fueron transportadas en cajas refrigerantes con hielo seco a una temperatura de -78°C , hasta la Universidad De Las Américas, para su respectivo procesamiento y análisis en el Laboratorio.

3.2.3. Identificación y cuantificación de levaduras

A partir de las muestras de grano fermentado de 100 g de cacao, mezcladas con 100 ml de agua peptonada. Durante 15 minutos las muestras se mezclaron a rpm para homogeneizar la dispersión de los microorganismos en el medio (Adaptado de Lagunes et al., 2006, pp. 34-45) Luego se tomaron 5 ml de cada funda mediante una micro pipeta y se inocularon en cajas Petri con un medio Sabouraud modificado con gentamicina adicional al 5%; E inoculadas a 23°C , durante 24 horas.

Una vez incubadas las cajas Petri, se identificaron colonias de levaduras morfológicamente distintas. Los resultados obtenidos se reportaron en unidades formadoras de colonias (ufc).

Una vez seleccionadas las cepas morfológicamente distintas, cada una se aisló en cultivo puro en agar Saburaud con cloranfenicol y se incubaron a 25°C Durante 72 h.

La identificación de las especies de levaduras presentes en la fermentación de los granos de cacao en las localidades de Vinces y Shushufindi se la realizaron mediante perfiles de identificación con un Kit API 20C AUX, de acuerdo con lo reportado en investigaciones hechas por Kurtzman y colaboradores (2011). Para este proceso se preparó una solución de 2 ml de NaCl al 0.85% en tubos de vidrio estériles. A la vez se realizó una solución estándar patrón al nivel 2 de Macfarlan. De la solución se tomaron 100 μl para colocar en el kit API C Medium, luego se homogenizó la muestra y se tomaron 180 μl de la solución para llenar los 20 domos del KIT API El cultivo utilizado tiene un tiempo de

crecimiento de 20 a 24 horas. Con la aza microbiológica se tomó una fracción de colonias y se las coloca en la solución salina para obtener una suspensión turbia similar al patrón 2 de Macfarlán. Una vez que las galerías se vuelvan turbias se puede proceder a la lectura de los resultados mediante el programa de identificación apiwebTM. Una vez finalizado este procedimiento, se dejó incubar durante 48 horas a 25°C y se realizó la primera lectura de resultados de identificación en la galería API. La segunda medición para confirmar, se realizó a las 72 horas.

3.2.4. Evaluación de levaduras comerciales y nativas en mejora de la fermentación

Los tratamientos que se evaluaron son: la levadura nativa (*Candida magnolie*), la levadura comercial (*Saccharomyce cerevisiae*) y el testigo (levadura propia del medio ambiente presente en la fermentación del cacao). Los cuáles serán evaluados en los siguientes parámetros: temperatura, pH e índice de fermentación durante todo el proceso de fermentación. Cada tratamiento constara de 15 réplicas y 3 repeticiones, y se las realizara para ambas variedades (“Nacional” y “Trinitario” clon CCN-51).

Para poder evaluar la influencia de levaduras en la fermentación de cacao se establecieron ensayos de inoculación controlada por la adición de levaduras comerciales y nativas. Se procedió a realizar un diseño de caja cuadrada de laurel con las siguientes medidas 15x15x15 cm esto se refiere a largo ancho y alto de la caja. Las cajas de laurel tendrán 15 perforaciones en la parte inferior, estos agujeros tienen un diámetro de 0.8 cm lo cual ayudara a la eliminación de exudado que presenta el cacao, además las cajas fueron colocadas en pallet de madera a 10cm del suelo.

La mezcla realizada fue ajustada a una concentración igual que el patrón 2 de la escala Macfarlán. Para la preparación de la levadura comercial se calentó la solución salina en baño maría a 25° C, para que las levaduras puedan estar activas. De igual manera la solución comercial se comparó con el patrón 2 Macfarlán (Camu et al., 2007, pp. 67-89).

Las cajas se llenaron con 2 kg de cacao en baba, las cuales se cubrieron con sacos de yute una vez iniciada la fermentación. Se adicionaron los tratamientos o la solución realizada en el laboratorio de *Candida magnoliae*, Levadura Comercial y en el caso del testigo no se adiciona ningún cultivo de levaduras. Luego se procedió a monitorear la temperatura y el pH de cada una de las cajas fermentadas cada 4 horas, hasta finalizar el proceso de fermentación. Se procedió a realizar un proceso de remoción o volteo de granos a las 24, 48 y 72 horas después de iniciada la fermentación. El proceso tuvo una duración de 5 días. Este ensayo se realizó con 15 réplicas de cada tratamiento. Esto se realizó para cada variedad (“Trinitario” clon CCN51 y Cacao Tipo “Nacional”).

Aislamiento en cultivo puro de *Candida magnoliae* y evaluación de levaduras en fermentación controlada en postcosecha.

Se aisló la levadura *Candida magnoliae*, la cual se utilizó en el proceso de evaluación de levaduras nativas y comerciales. Se multiplicó la levadura en cultivos puros en cajas Petri con agar Sabouraud. Luego de 24 horas se procedió a realizar un raspado con ayuda de una aza microbiológica de los cultivos puros de la levadura *Candida magnoliae* y se recolectaron en solución salina al 0.9%, previamente calentada a 37° C. Se recolectó en frascos de vidrio estériles en presentación de un litro. De igual manera se realizó este proceso de recolección para la levadura comercial.

Para el análisis de los resultados obtenidos en estos experimentos, se aplicó un diseño completamente al azar con 15 réplicas cada uno. El análisis de los datos se los realizó en el programa estadístico Minitab, aplicándose a las respuestas un análisis de varianza. Además, se realizó una comprobación de medias por la prueba de Tukey.

3.2.5. Determinación del índice de fermentación

Para la determinación del índice de fermentación se realizó la prueba de corte, una vez terminada la fermentación. Este proceso tiene como fin determinar el

grado de fermentación del grano por coloración interna o forma (estriada o lisa). Esta prueba determina el índice de fermentación y se utiliza para evaluar la aptitud que tienen los granos de cacao para la elaboración posterior de chocolate en la industria. Para esta determinación, se tomó una muestra de 100 granos de cacao y se evaluó el porcentaje de granos fermentados, violetas y pizarrosos en las 100 almendras. Para esto se realiza un corte longitudinal por el centro del grano y se examina la parte interna del grano. Se examinan ambas partes del grano de cacao en una superficie plana con luz de día y se clasifican por color y forma interna.

- Granos fermentados: Son granos que muestran una coloración marrón, por lo general su exocarpio es quebradizo y en su interior se muestra un estriado en todo el grano.
- Granos Violetas: Son granos que muestran una coloración violeta que puede ser fuerte o levemente violácea, su exocarpio está pegado al grano y generalmente no presenta estrías.
- Granos pizarrosos: Son granos que muestran una coloración gris o tienen un aspecto obscuro en su interior. En algunos casos tienen un tono verde y generalmente no presenta estrías (Rubio, 2013, p. 34).

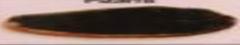
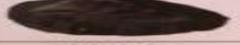
 CLASIFICACIÓN DE ALMENDRAS SECAS DE CACAO POR EL GRADO DE FERMENTACIÓN			
Características	Clasificación de los Granos	Causas	Efecto de las almendras en el chocolate
<ul style="list-style-type: none"> - Color: Marrón claro. - Exocarpio: Quebradizo. - Interior: Estriado. 	Fermentación buena 	<ul style="list-style-type: none"> - Fermentación adecuada y prolongada. 	<ul style="list-style-type: none"> - Aporta un sabor agradable y equilibrado. - Contribuye a la formación de aromas característicos del chocolate.
<ul style="list-style-type: none"> - Color: Marrón oscuro. - Exocarpio: Pegado al grano. - Interior: Sin estrías. 	Fermentación media 	<ul style="list-style-type: none"> - Fermentación adecuada pero no prolongada. 	<ul style="list-style-type: none"> - Aporta un sabor agradable pero con menos intensidad que el chocolate de buena fermentación.
<ul style="list-style-type: none"> - Color: Violeta. - Exocarpio: Pegado al grano. - Interior: Sin estrías. 	Violeta 	<ul style="list-style-type: none"> - Resultado de la fermentación de granos con alta humedad. 	<ul style="list-style-type: none"> - Aporta un sabor fuerte y característico. - Contribuye a la formación de aromas característicos del chocolate.
<ul style="list-style-type: none"> - Color: Gris. - Exocarpio: Pegado al grano. - Interior: Sin estrías. 	Pizarra 	<ul style="list-style-type: none"> - Ausencia de fermentación. 	<ul style="list-style-type: none"> - Aporta un sabor fuerte y característico. - Contribuye a la formación de aromas característicos del chocolate.
<ul style="list-style-type: none"> - Color: Negro. - Exocarpio: Pegado al grano. - Interior: Sin estrías. 	Mohoso 	<ul style="list-style-type: none"> - Alta humedad y temperatura durante la fermentación. 	<ul style="list-style-type: none"> - Aporta un sabor fuerte y característico. - Contribuye a la formación de aromas característicos del chocolate.
<ul style="list-style-type: none"> - Color: Negro. - Exocarpio: Pegado al grano. - Interior: Sin estrías. 	Infectado 	<ul style="list-style-type: none"> - Alta humedad y temperatura durante la fermentación. 	<ul style="list-style-type: none"> - Aporta un sabor fuerte y característico. - Contribuye a la formación de aromas característicos del chocolate.

Figura 6.- Tabla de clasificación de almendras secas de cacao por el grado de fermentación.

Tomado de: Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias, 2012.

4. CAPITULO IV RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Determinación del tamaño de muestra

Se determinó el peso procesado semanalmente en el centro de acopio de Republica de Cacao en Colaboración con COFINA (211 quintales de “Trinitario” clon CCN-51 y 28 quintales Variedad “Nacional”) y en el centro de acopio de Primavera Oriental (40 quintales variedad “Trinitario” clon CCN-51 y 15.2 quintales Variedad “Nacional” Primavera oriental). Esta cantidad fue lo máximo de producción que se recibía en los centros de acopio semanalmente (Tabla 1).

Tabla 1.
Peso máximo de producción en Kilogramos (kg)

República del Cacao		Primavera Oriental	
“Nacional”	2800kg	“Nacional”	1520kg
“Trinitario” clon CCN-51	21100kg	“Trinitario” clon CCN-51	4000kg

4.2. Identificación bioquímica de levaduras con mayor prevalencia en los granos de cacao durante el proceso de fermentación

Los resultados obtenidos mediante la prueba API20 AUX, mostraron la presencia de 10 aislados morfológicamente distintas de levaduras aisladas a partir de 195 muestras y pertenecientes al género *Kloeckera* spp. Y la *Candida magnoliae*. Estos géneros de levaduras se encontraron en la provincia de Shushufindi mientras que en la provincia de Los Ríos se encontraron 9 cepas morfológicamente distintas aisladas de 96 muestras pertenecientes a las especies *Candida magnoliae* y *Candida krusei*.

Las especies de levaduras que se aislaron durante el proceso de fermentación en la quinta primavera y en el recinto República de Cacao en Colaboración con COFINA fueron similares a las especies de levaduras encontradas en estudios realizados en otros países exportadores como: Brasil, Malasia, Alemania, República Dominicana, Ghana, Madagascar (Schwan y Wheals, 2004, pp. 134-145). Resaltar que hay otras especies que no se han reportado.

En el presente estudio para ambas localidades las levaduras identificadas de mayor presencia correspondieron a las especies *Saccharomyces cerevisiae*, *Kloeckera* spp. Y *Candida magnoliae*, similar a lo reportado por Schwan y Wheals (2004), Ardhana y Fleet (2009), Camu et al. (2007), Cleenwerck et al. (2008) y Cros et al. (1994). En cambio en estudios realizados por Schwan et al. (1995) la mayor parte de poblaciones de levaduras correspondientes a parte de *Saccharomyces cerevisiae* correspondieron a *Kloeckera apiculata* y *Kluyveromyces marxianus*. En donde una de las especies de mayor prevalencia en el proceso de la fermentación es la levadura *Saccharomyces cerevisiae*, seguida por el género *Candida* y *Kloeckera* que son las que tienen mayor presencia en el momento de la fermentación tanto en la variedad “Nacional” como en su clon CCN-51.

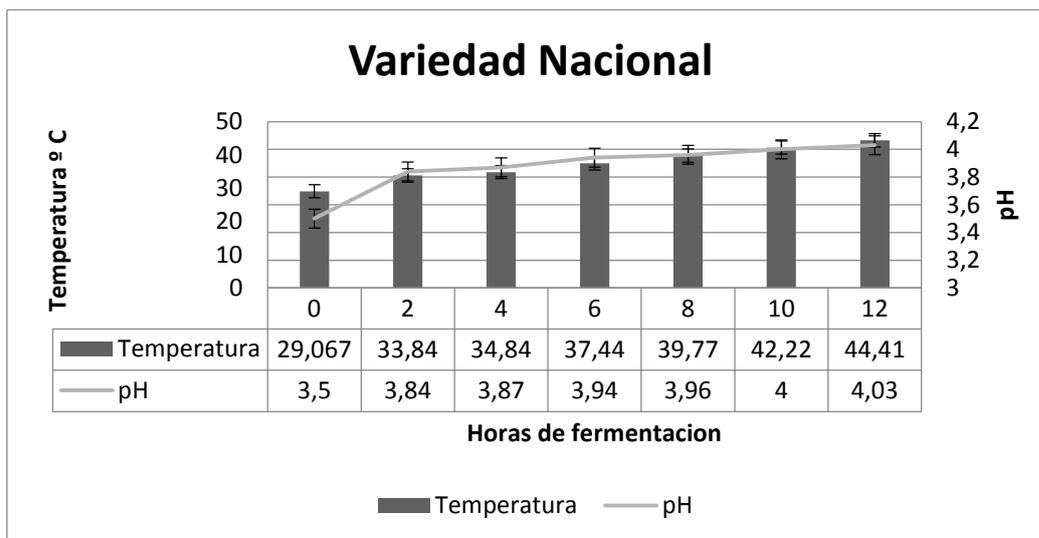
Por otro lado estudios realizados por Sánchez y colaboradores (1985), durante el proceso de fermentación se encontraron las siguientes levaduras: *Saccharomyces chevalieri* y *Candida norvegensis* en el inicio del proceso de fermentación. En República Dominicana, según estudios realizados por Lagunes y Gálvez (2006), las especies de levaduras predominantes fueron las siguientes: *Candida glabrata*, *Candida krusei*, *Candida inconspicua*, *Candida zeylanoides*, *Pichia fermentans*, *Hanseniaspora valbyensis* y *Hanseniaspora guilliermondii*. Se las encontró en mitad del proceso de fermentación. Finalmente, en Madagascar estudios realizados por Ravelomanana, Guiraud, Vincent y Galzy (1984), las levaduras más frecuentes fueron: *Kloeckera apiculata* y *Candida krusei*. Que aparecieron al final del proceso de fermentación llegando a 48°C y un pH de 4,2.

4.3. Factores abióticos circundantes durante el proceso de fermentación

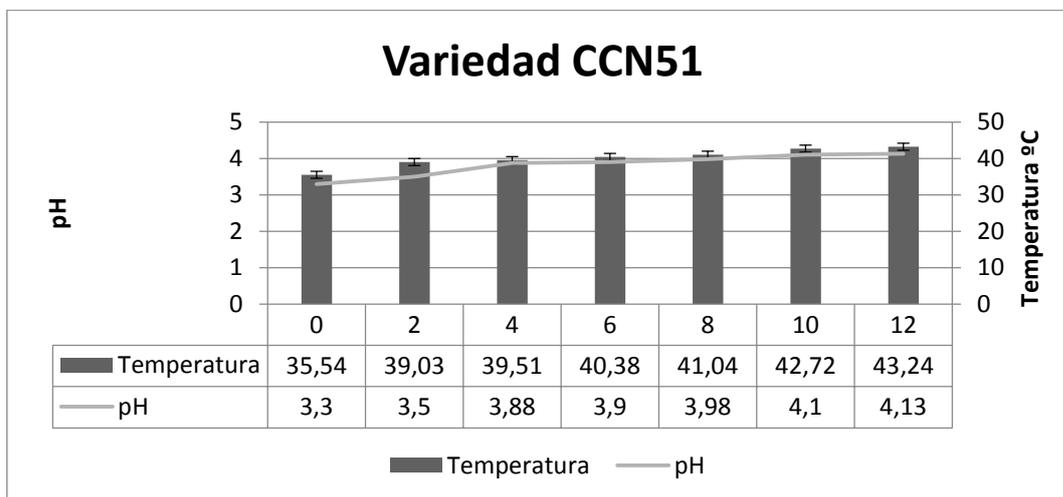
Una vez iniciado el proceso de fermentación, después de un periodo de 24 horas de desbabado, el valor del pH de la pulpa de cacao fue de 3.5 ± 0.1 , en el caso de la variedad “Nacional” y de 3.3 ± 0.10 en la variedad “Trinitario” clon 51. Posterior a 12 horas de iniciado el proceso de fermentación, el valor de pH

de la variedad “Nacional” ascendió a 4.03 ± 0.1 y el pH de la mezcla de la variedad “Trinitario” clon CCN-51 llegó hasta 4.13 ± 0.1 .

La temperatura monitoreada paralelamente al pH inicialmente fue de 29.06°C y el registro final fue de 44.41°C en la variedad “Nacional” (Figura 7). La temperatura máxima fue más baja en el caso de la variedad “Trinitario” clon CCN51 (35.54°C al inicio y al culminar llegó a 43.24°C) como se observa en la Figura 7.



a)



b)

Figura 7. Curva de temperatura y pH en las variedades “Nacional” y “Trinitario” clon CCN51 en función del tiempo de fermentación.

a) Variedad “Nacional”.

b) Variedad “Trinitario” clon CCN51.

Según estudios realizados por Schwan y Wheals (2004) la densidad relativa de la pulpa se mantuvo casi constante esto debido a la constante humedad ($80 \pm 2\%$), entre las dos variedades de cacao (“Nacional” y “Trinitario” clon CCN-51). Por otro lado, el pH se mantuvo en curva ascendente entre 3.50 y 4.13, lo cual concuerda con valores de acidez en el fruto de cacao maduro según estudios realizados por Shaposhnikova (1952) esto es porque la variedad de Cacao “Nacional” presentó porcentajes de pH más bajos (4.03) en comparación a la variedad “Trinitario” clon CCN-51 (4.13). Esto podría explicarse por estudios realizados por Pettipher (1986) que indica que la relación entre la concentración del ácido cítrico es inversamente proporcional al pH de la pulpa del cacao; lo cual se entiende por la dominancia del ácido cítrico sobre los demás ácidos: Aspártico, Oxálico, Tartárico, Málico y Glutámico.

Según los estudios realizados por Camu, De Winter, Takrama, Bernaet y De Vyust (2007) se produce un incremento de la temperatura durante las primeras 12 horas del proceso de fermentación de los granos de cacao y se debe al consumo de la glucosa y sus derivados por acción de las levaduras. En Ghana, según estudios realizados por Nielsen, Teniola, Ban-Koffi, Owusu, Andersson y Holzapfel (2007), se llegó a la conclusión de que la temperatura inicial de fermentación del cacao es de entre 32 y 36°C y su temperatura final de 42 a 46°C. Esto es muy similar a lo que se pudo observar en la localidad de Vines donde la temperatura inicial (en las primeras 12 horas del proceso de fermentación) fue de 29.06°C en la variedad de “Nacional” y de 35.54°C en la variedad “Trinitario” clon CCN-51. En cambio, la temperatura final alcanzó 44.41°C en la variedad de “Nacional” y de 43.24°C en la variedad “Trinitario” clon CCN-51.

Se conoce que a variedad “Trinitario” clon CCN51 al ser un clon resistente a plagas y enfermedades es muy adaptable a los ecosistemas donde la variedad “Nacional” no se puede desarrollar por esto el clon CCN51 alcanza una temperatura elevada y un pH mayor en las 12 horas de fermentación.

4.4. Cuantificación de levaduras presentes en la fermentación de cacao

En el presente estudio se pudieron identificar especies de levaduras: *Saccharomyces cerevisiae*, *Kloeckera* spp. Y *Candida* spp. *Candida magnoliae* es una especie de levadura que se encontró en las dos localidades tanto en Vinces, provincia de Los Ríos como en Shushufindi, provincia de Sucumbíos. Esta especie (*Candida magnoliae*) fue la que se encontró en mayor número en la variedad “Nacional” con un 83% (log7.70 Ufc. /G de muestra) en las dos zonas de muestreo y representó también un gran porcentaje en el clon CCN51 con un 42% (log8.15 Ufc. /g) en ambas localidades, como se indica en las Figura 8.

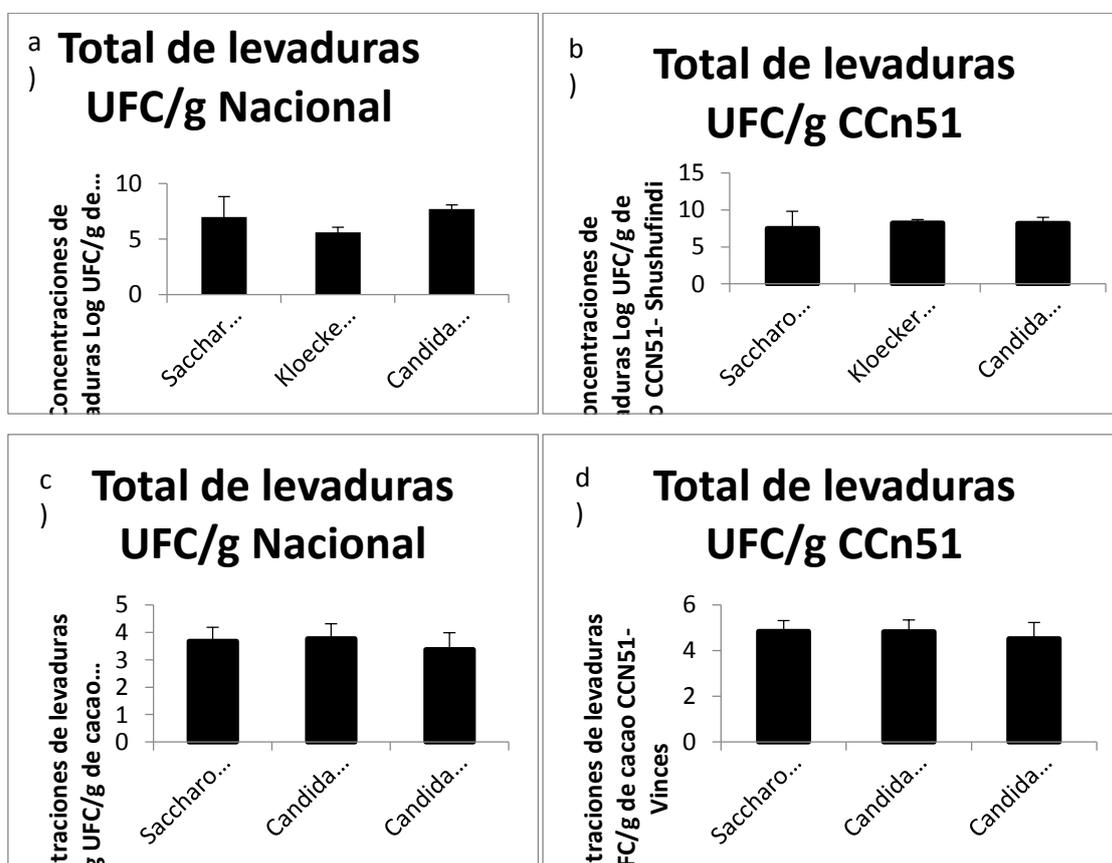


Figura 8. Total, de levaduras UFC/g Variedad “Nacional” y “Trinitario” clon CCN51 cantón de Vinces y Shushufindi.

- Total, de levaduras UFC/g “Nacional” cantón de Sushufindi-Sucumbios
- Total, de levaduras UFC/g “Trinitario” clon CCN51 cantón de Sushufindi- Sucumbios.
- Total, de levaduras UFC/g “Nacional” cantón de Vinces- Los Ríos
- Total, de levaduras UFC/g “Trinitario” clon CCN51 cantón de Vinces- Los Ríos

En un estudio realizado por Camu et al (2007), se concluyó que algunas especies de *Candida* spp. Se mantienen poco numerosas hasta el final de las 12 primeras horas, pero son más numerosas después de las 15 horas del proceso de fermentación. Se nota este comportamiento en el presente estudio ya que la levadura *Candida magnoliae*, es la más numerosa en la variedad “Nacional” en el recinto Primavera Oriental en la localidad de Shushufindi.

En 44 horas después de iniciado el proceso de fermentación, el género *Kloeckera* spp demostró ser el más numeroso en la variedad “Trinitario” clon CCN51 en la provincia de Sucumbíos con 49.19% a diferencia de la variedad “Nacional” que tiene 1% de este género, en la provincia de Los ríos no se encontró el género *Kloeckera* spp., cómo se indican en las Figura 8.

Según estudios realizados por Ho et al (2014), las levaduras: *Hanseniaspora guilliermondii* y *Kloeckera apis*, son algunas de las levaduras que durante las 24 horas iniciales tienen mayor dominancia en el proceso de fermentación del cacao. Esto se pudo observar en el presente estudio ya que en la Variedad “Trinitario” clon CCN-51 del Recinto Primavera, la levadura *Kloeckera* spp. Fue la que tuvo predominancia y estaba seguida de la levadura *Candida magnoliae*.

La especie *Saccharomyces cerevisiae* se encontró en las dos localidades, en la variedad “Nacional” y en la variedad “Trinitario” clon CCN51. En este último se presentó en 9% en la provincia de Sucumbíos, a diferencia en la localidad de Los Ríos la Variedad “Nacional” con el 37% y su clon CCN51 con el 40% como se indican en la Figura 8. En base a estudios realizados por (Schwan, 1998, pp. 1477-1483), se reporta que la especie *Saccharomyces cerevisiae* var *chevalieri* y *Candida magnoliae* se encuentran desde las primeras 12 horas de la fermentación y en la pulpa fermentan azúcares a pH de 3,5 hasta 4,2 por su tolerancia al etanol. En el recinto Republica de Cacao en Colaboración con COFINA de la localidad de Vinces, se pudo observar que la levadura *Candida magnoliae* fue predominante y tuvo un 45% del total de la muestra; seguida de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* 1 con un 37% del total de la muestra.

En este ensayo se pudo determinar que las levaduras predominantes son similares a estudios realizados y son generadoras de compuestos organolépticos como: acetato de isopropilo, metanol, acetato de etilo, 1-propanol, 2,3-butanodiol, alcohol isoamilico, 2-feniletanol, y succinato de dietilo, lo que concuerda con estudios realizados por Schawn y Wheals en el año 2004.

En el caso de la *Candida magnoliaea*, que es la levadura con mayor predominancia en este ensayo, se la conoce también como levadura fructofílica, ya que transforma la fructosa en eritritol (un sustituto del azúcar). Esta levadura es la encargada de transformar el ácido cítrico en etanol. Lo que denota similitud con estudios realizados por Ardhanna y Fleet en el año 2009 en Ghanna. Por esta razón se seleccionó esta especie para realizar los ensayos de inoculación artificial.

4.5. Ensayo de la influencia inoculantes de levaduras en el proceso de fermentación

En los siguientes gráficos se puede visualizar el incremento de temperatura y pH con respecto al tiempo, en las dos variedades “Nacional” (Figura 9) y “Trinitario” clon CCN-51 (Figura 9), con tres tratamientos: Tratamiento 1: Testigo (Microbiota Natural), Tratamiento 2: Levadura comercial (*Saccharomyces cerevisiae*) y Tratamiento 3: *Candida magnoliae*.

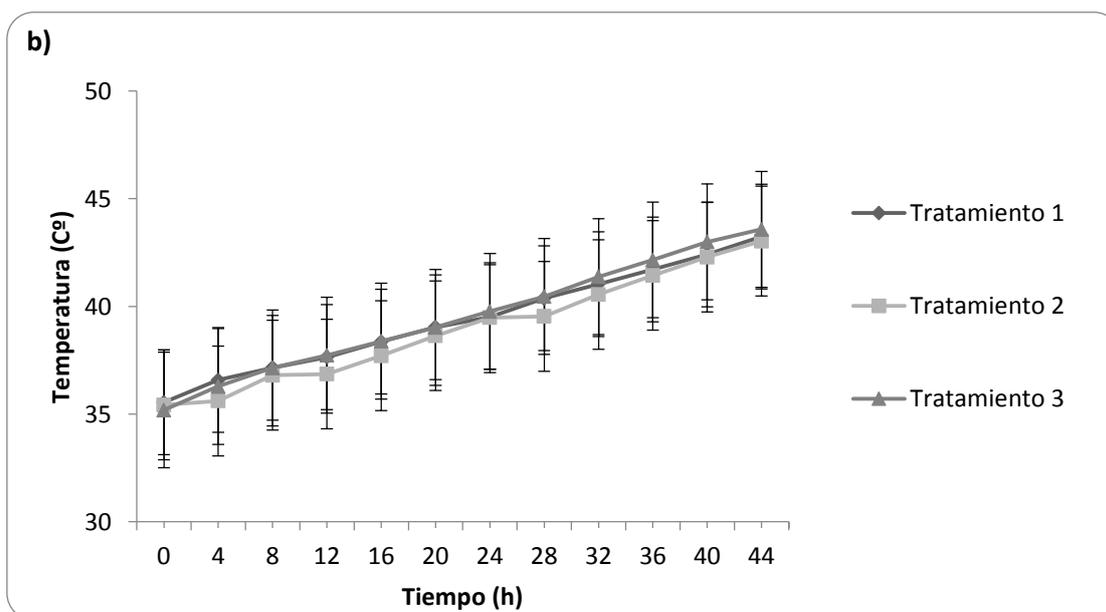
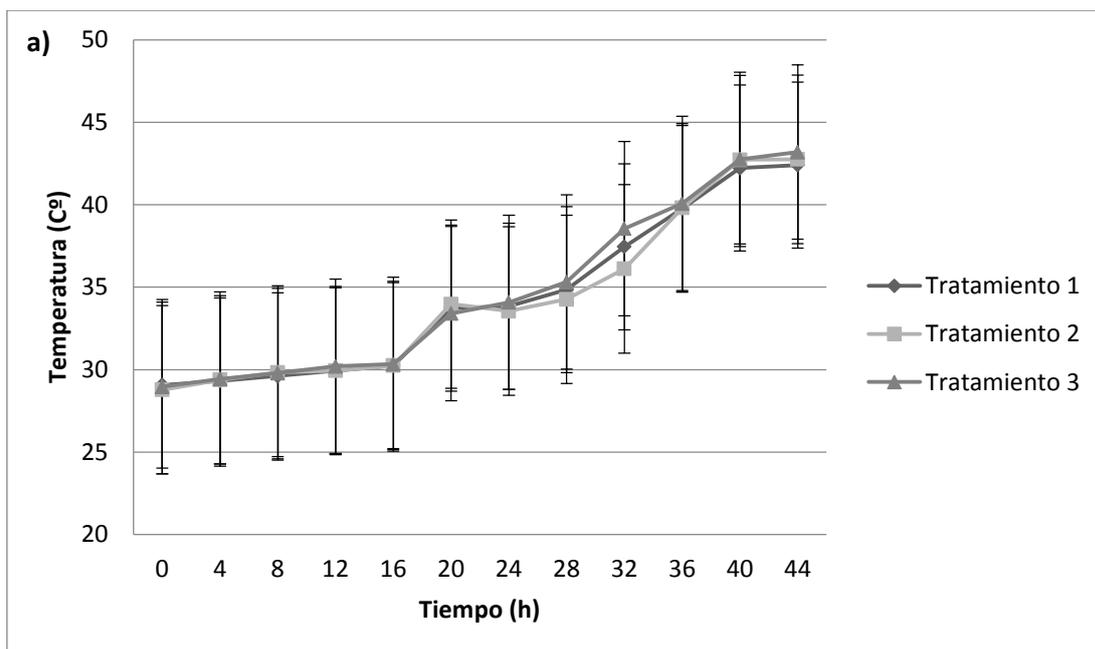


Figura 9. Promedio de la variación de temperatura en cacao variedad “Nacional” y “Trinitario” clon CCN51 durante el período de fermentación con inoculación artificial de levaduras.

a) Promedio de la variación de temperatura en cacao variedad “Nacional” con cada uno de los tratamientos.

b) Promedio de temperatura en Variedad “Trinitario” clon CCN51 de cada uno de los tratamientos.

Los tratamientos corresponden a *Saccharomyces cerevisiae* comercial (10^9 células/ g de pulpa de cacao) y *Candida Magnoliae* (10^9 células/ g de pulpa de cacao). Los datos en cada punto corresponden al promedio de 3 repeticiones

Al iniciar la fermentación, se registró la temperatura inicial de las mezclas de cacao en baba. La temperatura de la variedad "Nacional" osciló entre 29.07° C y 31° C al inicio del proceso. Con el pasar de las horas se observó un incremento de temperatura en todos los tratamientos y al finalizar (44 horas) se registró una temperatura de 42.41° C en el testigo, 42.75° C en las muestras tratadas con *Saccharomyces cerevisiae* y 43.19° C en el tratamiento con *Candida magnoliae*, (Figura 9). De manera general, la temperatura de la masa de cacao en el proceso de fermentación aumentó por acción de las levaduras. Estos resultados concuerdan con los trabajos reportados por Nielsen et al (2007) donde se determinó que la temperatura con la que inicia la fermentación es de 28° C y culmina a las 44 horas con una temperatura final de $46-48^{\circ}$ C su pico máximo, tomando en cuenta que la temperatura inicial es la temperatura ambiente. En la fase experimental se aplicó un diseño estadístico multifactorial al 95% de confianza para poder determinar la significancia de los tratamientos que se aplicaron. Se obtuvo un valor p de 0.7495 con lo que se afirma que ninguno de los tratamientos fue distinto ya que el valor de significancia es de 0.05 con respecto al tiempo en la variable de la temperatura para la variedad "Nacional".

Como se observó en la figura 9, los tratamientos para la variedad "Nacional" en temperatura T1, T2 Y T3 son iguales o presentan una igualdad, no se genera una diferencia significativa en un análisis estadístico general, se aplica un ANOVA Multidireccional y se obtuvo un valor p de 0.2987 lo que representa que el valor obtenido es mayor al valor de significancia es (0.05) el nivel de confianza que se utilizó fue de 95% con lo que se entiende que no hay diferencia entre tratamientos por lo cual hay una alta fiabilidad en los tratamientos.

Al iniciar la fermentación se tomó la temperatura del testigo y de los dos tratamientos. En la variedad “Trinitario” clon CCN51 esta variable osciló entre 35.6°C con el pasar de las horas, se llegó a observar un incremento de temperatura en cada uno de los tratamientos para finalizar a las 44 horas con una temperatura de 43.25°C en el Testigo, 43.1°C en *Saccharomyces cerevisiae* y 43.6°C en *Candida magnoliae* (Figura 9).

En la fase experimental se aplicó un diseño estadístico multifactorial al 95% de confianza para poder determinar la significancia de los tratamientos que se aplicaron. Se obtuvo un valor p de 0.6439 y un valor de significancia es de 0.05 con lo cual se afirma que ninguno de los tratamientos fueron diferentes estadísticamente con respecto al tiempo en la variable de la temperatura para la variedad “Trinitario” clon CCN51.

Para la evaluación del pH en los tratamientos T1, T2 Y T3 en la variedad “Nacional” se aplicó un ANOVA Multidireccional, con un nivel de confianza de 95%, y se obtuvo un valor p de 0.3037, mayor al valor de significancia (0.05), por lo que no se presentaron diferencia entre tratamientos, es decir que existe una alta fiabilidad en los tratamientos.

En las figura 10 se puede observar la tendencia ascendente del factor temperatura con respecto al tiempo, hasta la finalización del proceso de fermentación en ambas variedades estudiadas. Se puede observar que la variable Nativa en los tratamientos alcanzó una temperatura mayor frente a las otras dos variables; además la variedad “Trinitario” clon CCN51 logró obtener una temperatura mayor que la “Nacional” en el momento de la fermentación. Según Ho, Zhao y Fleet (2014) esto se debe a que la variedad “Trinitario” clon CCN51 es un clon de mayor resistencia tanto a plagas como enfermedad, por lo cual tiene una predisposición a desarrollarse con mucha más facilidad en los entornos que lo rodean.

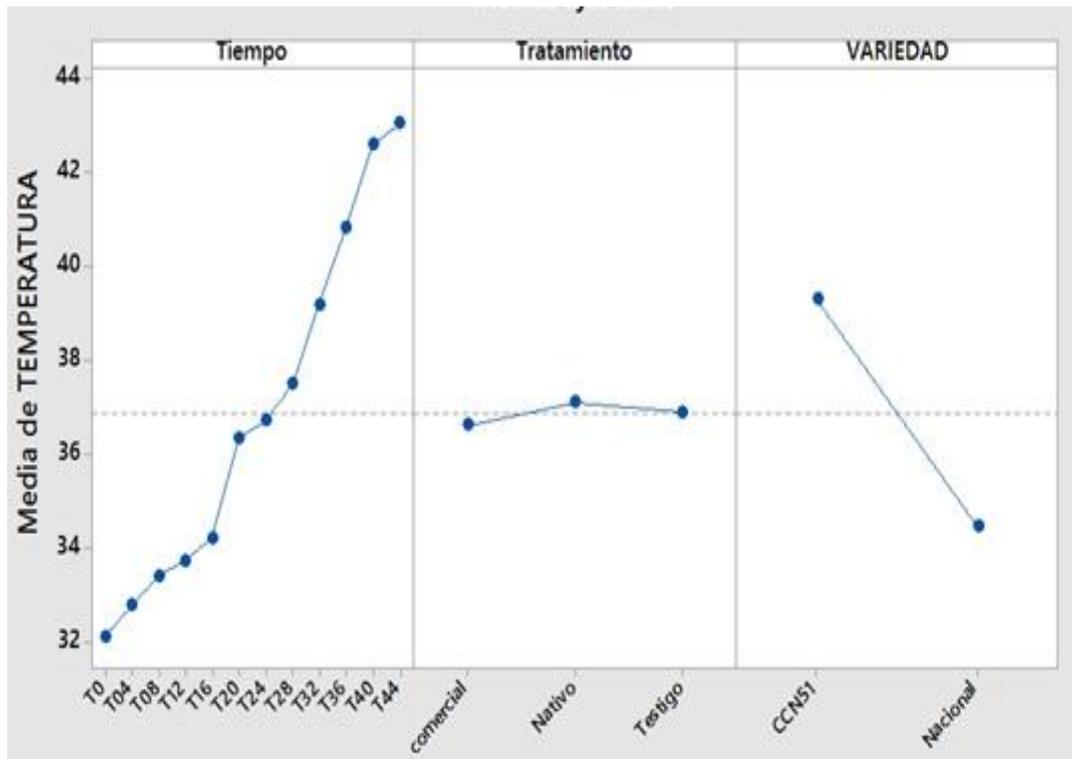


Figura 10. Análisis estadístico curva de crecimiento temperatura variedad “Nacional” vs “Trinitario” clon CCN51 respecto al tiempo programa Minitab.

Tabla 2.

Valor F y Valor P de la temperatura de variedad “Nacional” vs “Trinitario” clon CCN51

	T0	T4	T8	T12	T16	T20	T24	T28	T32	T36	T40	T44
V.F	0.16	0.09	0.3	0.47	0.05	0.07	0.09	0.41	1.39	0.02	0.36	0.84
V.P	0.853	0.915	0.743	0.626	0.949	0.947	0.918	0.669	0.260	0.979	0.698	0.438

Además, se realizó se corrió los datos en el programa Minitab individualmente por hora de fermentación. Se realizó un análisis estadístico para visualizar si existía significancia entre horas de fermentación y cuando cambiaba, como se puede observar en los resultados los valores obtenidos cada hora no fueron significantes ya que el valor de significancia es de 0.05 y los datos obtenidos resultaron mayores en cuanto a la temperatura para ambas variedades tanto “Nacional” como “Trinitario” clon CCN51, factor que influye positivamente en el incremento del índice de fermentación del grano de cacao (Ho, Zhao y Fleet,2014, pp. 234-254).

4.6. Promedios de pH evaluados en el proceso de fermentación en la variedad “Nacional” y “Trinitario” clon CCN51

El pH se determinó al colocar los granos de cacao en las cajas fermentadoras. Este pH inicial para la variedad de “Nacional” osciló entre 3.49 y 3.5 en el caso del testigo, los tratamientos con *Saccharomyces cerevisiae* y *Candida Magnoliae*, Al paso de las 44 horas de fermentación de cacao el pH tendió a subir, donde sus valores finales fueron de 4.03 en el testigo, 4.07 en *Saccharomyces cerevisiae* y 4.11 en *Candida Magnoliae* como se indica en la (Figura 11).

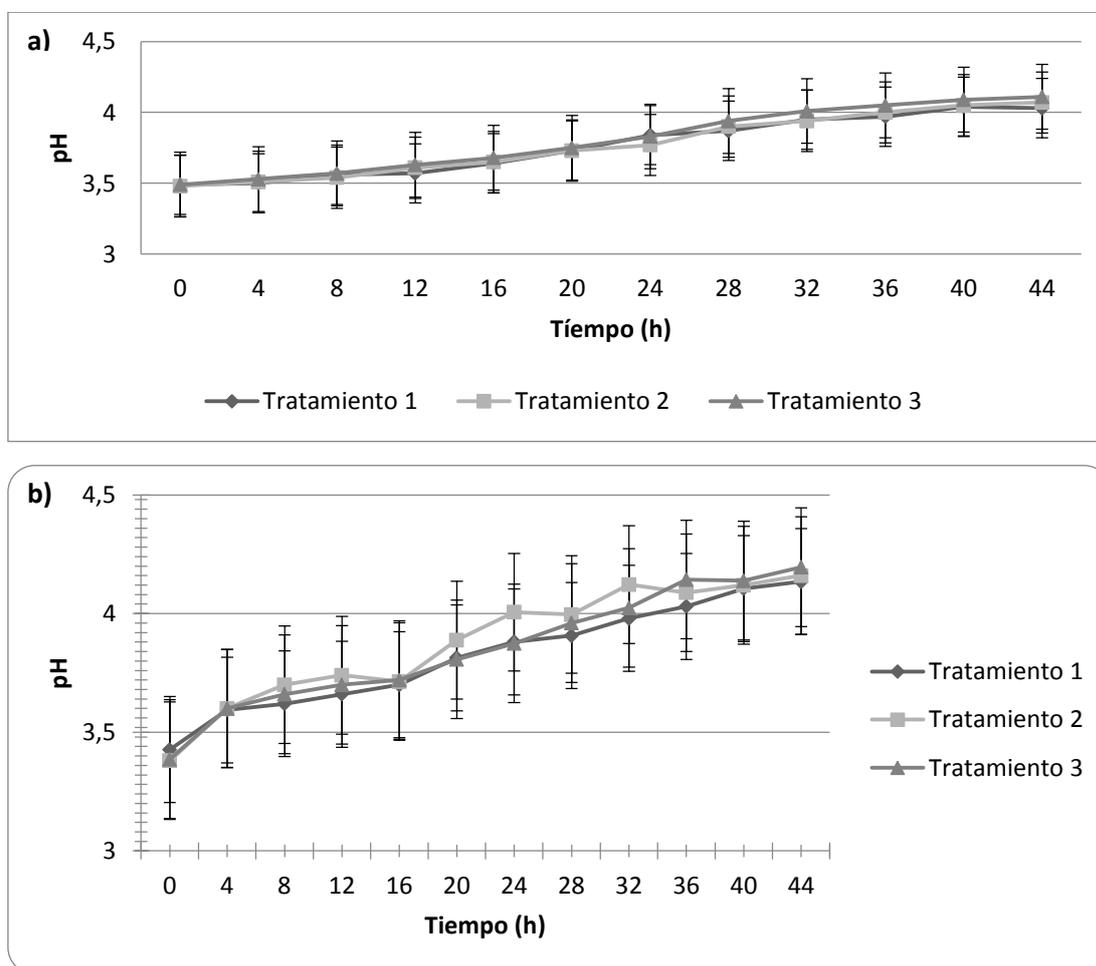


Figura 11. Promedio de pH de cada uno de los tratamientos variedad “Nacional” y “Trinitario” clon CCN51.

a) Promedio de pH de cada uno de los tratamientos variedad “Nacional”.

b) Promedio de pH de cada uno de los tratamientos variedad “Trinitario” clon CCN51.

Tratamiento 1 Testigo: Microbiota natural. Tratamiento 2 *Saccharomyces cerevisiae*: Levadura comercial. Tratamiento 3 *Candida Magnoliae*: Aislado del Cacao.

En trabajos anteriores realizados por Nielsen et al. (2007) se muestra que en Ghana el pH inicia 3.50 y alcanza un valor de 4.13 al final de la fermentación. Además el pH se mostró de manera creciente de manera ascendente de 3.5 a 4.1 lo cual concuerda con los valores que de ácidos en el fruto maduro según estudios previos realizados por (Shaposhnikova, 1952, pp. 83-90). Como se observó que los tratamientos para la variedad "Trinitario" clon CCN51 en temperatura T1, T2 Y T3 son iguales o presentan una igualdad, no se genera una diferencia significativa en un análisis estadístico general, se aplica un ANOVA Multidireccional y se obtuvo un valor p de 0.1654 lo que representa que el valor obtenido es mayor al valor de significancia es (0.05) el nivel de confianza que se utilizó fue de 95% con lo que se entiende que no hay diferencia entre tratamientos por lo cual hay una alta fiabilidad en los tratamientos.

El pH inicial para la variedad de "Nacional" osciló entre 3.38 y 3.42 para el testigo. *Saccharomyces cerevisiae* y *Candida magnoliae*. Al paso de las 44 horas de fermentación de cacao el pH tendió a subir y sus valores finales fueron de 4.14, 4.15 y 4.20 respectivamente como se indica en la (Figura 11). En comparación con la variedad "Nacional" el pH de la variedad "Trinitario" clon CCN51 tiende a incrementar más su nivel de pH esto se podía explicar en los estudios realizados por (Pettipher, 1986) que indica la relación entre concentración de ácido cítrico es inversamente proporcional al pH de la pulpa del cacao; lo cual se entiende por la dominancia del ácido cítrico sobre los demás ácidos: Aspártico, Oxálico, Tartárico, Málico y Glutámico, por esto la variedad "Trinitario" clon CCN51 se asume que hay más presencia de ácido cítrico en su composición que la variedad "Nacional".

En la figura 12 se puede observar la tendencia de crecimiento de las variedades tanto "Nacional" como "Trinitario" clon 51 una tendencia

ascendente en el factor del pH hasta la finalización del proceso de fermentación. Se puede observar que la variedad Nativa en los tratamientos alcanzó un mayor pH en las dos variedades y que la variedad “Trinitario” clon CCN51 logró un pH mayor que la variedad “Nacional” en el momento de la fermentación.

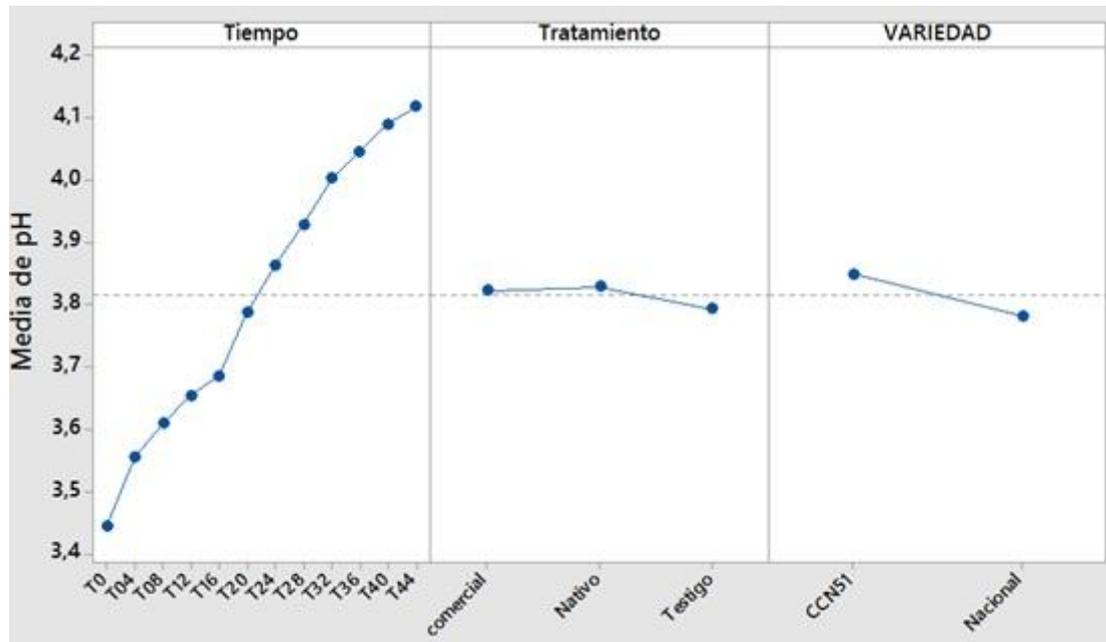


Figura 12. Análisis estadístico Curva de crecimiento pH variedad “Nacional” vs “Trinitario” clon CCN51 respecto al tiempo programa Minitab.

Tabla 3.

Valor F y Valor P de la temperatura de variedad “Nacional” vs “Trinitario” clon CCN51.

	T0	T4	T8	T12	T16	T20	T24	T28	T32	T36	T40	T44
V.F	0.16	0.09	0.3	0.47	0.05	0.07	0.09	0.41	1.39	0.02	0.36	0.84
V.P	0.853	0.915	0.743	0.626	0.949	0.947	0.918	0.669	0.260	0.979	0.698	0.438

Como se observó que los tratamientos para la variedad “Trinitario” clon CCN51 en pH T1, T2 y T3 son iguales o presentan una igualdad, no se genera una diferencia significativa en un análisis estadístico general, se aplica un ANOVA Multidireccional y se obtuvo un valor p de 0.1457 lo que representa que el valor obtenido es mayor al valor de significancia es (0.05) el nivel de confianza que se utilizó fue de 95% con lo que se entiende que no hay diferencia entre tratamientos por lo cual hay una alta fiabilidad en los tratamientos.

Además, se realizó se corrió los datos en el programa Minitab individualmente por hora de fermentación. Se realizó un análisis estadístico para visualizar si existía significancia entre horas de fermentación y cuando cambiaba, como se puede observar en los resultados los valores obtenidos cada hora no fueron significantes ya que el valor de significancia es de 0.05 y los datos obtenidos resultaron mayores en cuanto al pH para ambas variedades tanto “Nacional” como “Trinitario” clon CCN51.

4.7. Índice de Fermentación en las Variedades “Nacional” y “Trinitario” clon CCN51

Los resultados obtenidos al realizar de la prueba de corte a los granos de cacao de la Variedad “Nacional” se resumen en la (Figura 14). Se puede observar el porcentaje de granos de color marrón, violeta y pizarroso. Esto se asocia con el índice de fermentación que tuvo cada tratamiento.

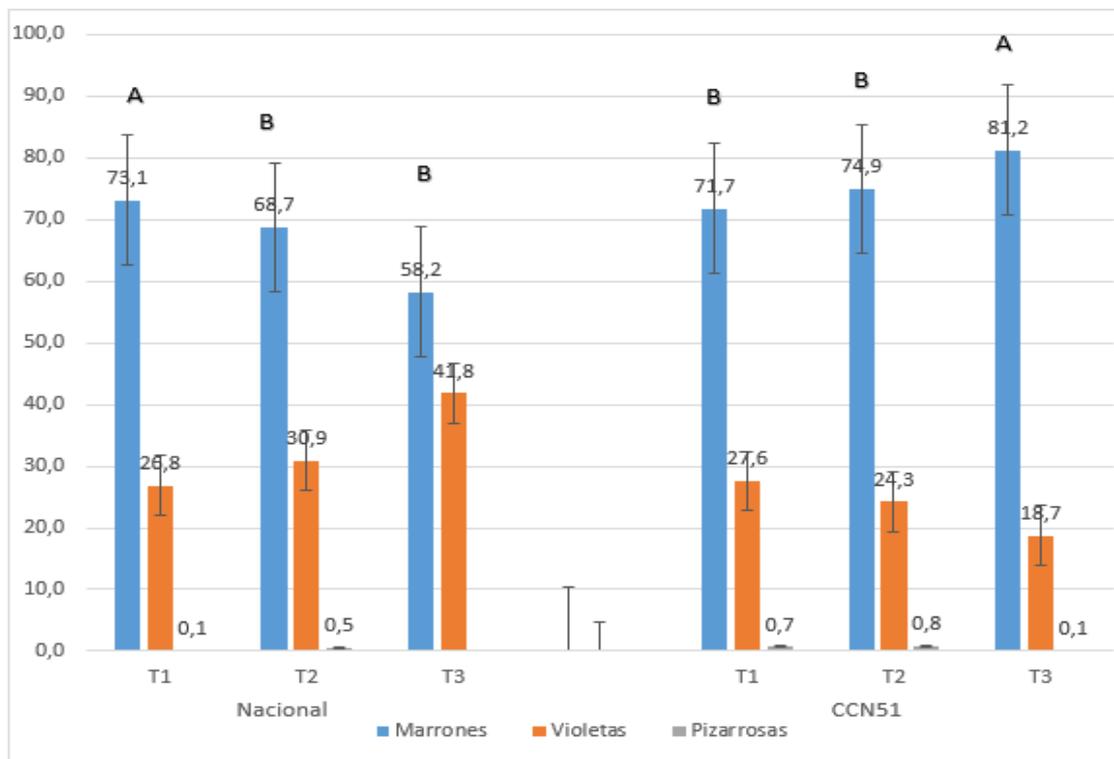


Figura 14. Calidad de grano luego de fermentación y secado de cacao Variedad “Nacional” y “Trinitario” clon CCN-51. Las barras representan el promedio de los granos.

De igual manera el resultado que se logró obtener al realizar la prueba de corte a los granos de cacao de la Variedad “Trinitario” clon CCN51 se resume en la Figura 14. En donde se puede observar el porcentaje de granos de color marrón, violeta y pizarroso; lo que representa el índice de fermentación que tuvo cada uno de los tratamientos, los cuales son: T1.- Testigo (Microbiota natural). T2.- *Saccharomyce cerevisiae* (Levadura comercial) y T3.- *Candida Magnolie* (Aislado del Cacao).

Además, se describe los resultados obtenida por la prueba de comparaciones de múltiples de Tukey en los granos de color marrón. Como se observó que los tratamientos para la variedad “Nacional” T2 y T3 son iguales o presentan una igualdad, al contrario que el tratamiento T1 si genera una diferencia significativa con el 95% de confianza. Se aplicó un ANOVA Unidireccional y se obtuvo un valor p de 0.009 lo que representa que el valor obtenido es menor al valor de significancia es (0.05) con lo que se entiende que un tratamiento es diferente a los otros estadísticamente.

Con respecto al índice de fermentación, el testigo presento el índice mayor 0.71 ($\sigma=0,273$) frente a las otras dos variables. *Saccharomyces* (levadura comercial) presento un índice de fermentación de 0.68 ($\sigma=0,273$) y *Candida magnolie* (la levadura nativa extraída del cacao en baba) presentó un índice de fermentación de 0.58 ($\sigma=0.1213$).

En la variedad “Trinitario” clon CCN51 se observó que los tratamientos T1 y T2 presentan resultados similares. Al contrario el tratamiento T3 presentó un valor p de 0.001, menor al valor de significancia (0.05), por lo que este tratamiento presento diferencias significativas frente al T1 y T2

La levadura nativa extraída del cacao en baba *Candida magnoliae* obtuvo un índice de fermentación mayor a las otras dos variables con un índice de fermentación de 0.81 con una desviación estándar del 0,373 a diferencia de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* que fue la levadura comercial con un índice de fermentación de 0.75 y una desviación estándar de 0.281 y como resultado sus resultados son inferiores, finalmente el testigo del cacao en baba

su índice de fermentación fue de 0.72 y una desviación estándar de 0.272.

Según (INIAP, 2012) Para poder determinar el índice de fermentación o (IF) una vez el proceso de fermentación haya concluido y el grano de cacao se encuentre seco o semi seco con una humedad relativa de 5-7 %. Para poder identificar la estructura del grano y su porcentaje de fermentación se empleó la norma N°442-95 COVENIN (1995), además la norma INEN N. ° 176, 177,178.

5. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1. Conclusiones

Se logró identificar las levaduras de mayor prevalencia en el cacao “Nacional” y “Trinitario” clon CCN-51 en baba de la provincia de Sucumbíos y Los Ríos. Las especies identificadas en la zona de Vinces, provincia de Los Ríos, fueron *Candida magnoliae* en un 45%, *Saccharomyces cerevisiae* en un 37%, y *Candida krusei* en un 2.18%. Mientras que en la zona de Shushufindi, provincia de Sucumbíos, fueron *Candida* spp. Con un 83%, *Saccharomyces cerevisiae* con un 16% y *Kloeckera* spp. Con un 1%. La levadura *Candida magnoliae* fue la que tuvo mayor predominancia en ambas especies de cacao (“Nacional” y “Trinitario” clon CCN-51) tanto en Vinces como en Shushufindi. Por lo que se la utilizó para inocular las muestras de cacao en el campo en las dos variedades.

Para la evaluación del efecto de las levaduras inoculadas en el proceso de fermentación del grano de cacao, se evaluó tres parámetros, la temperatura, el pH y el índice de fermentación. Indicadores que permiten determinar el grado de influencia en las levaduras en la fermentación.

En el estudio que se realizó en la provincia de Los Ríos (zona de Vinces), para las dos variedades de cacao tanto “Nacional” como “Trinitario” clon CCN51, el tratamiento 3 (*Candida magnoliae*) alcanzó una mayor temperatura y pH en el proceso de fermentación, en relación al tratamiento 2 (*Saccharomyces cerevisiae*) y al testigo. Se presume que el incremento de temperatura y del pH en el tratamiento 3 fue mayor por haber utilizado *Candida magnoliae* inoculada del mismo cacao.

En el índice de fermentación de la variedad “Nacional”, el tratamiento testigo presentó el índice mayor con un 73.13%, seguido del tratamiento 2 (*Saccharomyces cerevisiae*) con un 68.73% y finalmente el tratamiento 3 (*Candida magnoliae*) con un 58.20%. Sin embargo en el índice de fermentación de la variedad “Trinitario” clon CCN-51, el tratamiento 3 (*Candida magnoliae*)

presentó el índice superior con 81.2%, seguido del tratamiento 2 (*Saccharomyces cerevisiae*) con 74.93% y del testigo con 71.73%.

5.2. Recomendaciones

Para la toma de muestra se debe realizar un análisis minucioso a las cantidades de cacao como materia prima que reciben las dos empresas para así poder tener una muestra significativa de la zona experimental se debe realizar unas medias de tres meses para poder sacar la toma de muestra.

En lo que respecta a la identificación de microorganismos por prevalencia en las dos variedades se lo realiza mediante la prueba Kit API 20C AUX para poder determinar las levaduras de mayor prevalencia como fueron *Candida* spp., *Kloeckera* spp. y *Saccharomyces cerevisiae* se recomienda realizar un estudio posterior a nivel molecular para la identificación más a fondo de los microorganismos con lo que se recomienda levaduras aisladas usando las secuencias de las regiones ITS1, ITS2 o las secuencias del gen ARN 5.8s.

Se recomienda un estudio de los compuestos presentes en el proceso de la fermentación tanto como bioquímicos los cuáles son los que intervienen en el proceso de incremento de temperatura como el % de pH para poder encontrar la relación entre las reacciones bioquímicas y la calidad del grano de cacao.

Se debería ampliar los estudios incorporando técnicas de biología molecular y de dinámica de poblaciones para tener mayor detalle de la dinámica del proceso e interacción de los microorganismos particularmente.

REFERENCIAS

- Afoakwa, E., Paterson, A., Fowler, M., & Ryan, A. (2008). *Flavour formation and character in cocoa and chocolate: A critical review*. (Afoakwa, Ed.) *Reviews in Food Science, Willie Blackwey* 48(2), pp 840-857.
- Ågren, J. (1996). *Population size, pollinator limitation, and seed set in the self-incompatible herb *lythrum salicaria**. *Cambridge University Press. Ecology*, 77(6), pp. 1779-1790.
- Agropecuarios. (2008). *Metodo de Fermentacion del Cacao*. Recuperado 20 de Noviembre 2017, de: <http://agropecuarios.net/metodos-de-fermentacion-del-cacao.html>
- Alvarado, A., Bulgarelli, J., & Moya, B. (2000). Germinación del polen en poblaciones derivadas de un híbrido entre *Elaeis guineensis* Jacq. y *E. oleifera* HBK, Universidad de Colombia. Cortes. *ASD Oil Palm Papers*, 20(6), pp. 35-38
- Alvarado, A., Escobar, R., & Henry, J. (2013). El híbrido OxG Amazon: una alternativa para regiones afectadas por Pudrición del cogollo en palma de aceite. Facultad de ciencias Agrarias. *Revista Palmas*, 34(1) pp. 305-314.
- Alvarado, A., Escobar, R., & Peralta, F. (2010). El programa de mejoramiento genético de la palma aceitera de ASD Costa Rica y su contribución a la industria. *Publindex. ASD Papers*, 34(3), pp. 1-32.
- Appiah, S., & Agyei-Dwarko, D. (2013). *Studies on Entomophil pollination towards sustainable production and increased profitability in the oil Palm: a review*. *CRC Press. Agriculture*, 55(7), pp. 12878-12883.
- Ardhana M; Fleet G. (2009). *The microbial ecology of cocoa bean fermentations in Indonesia*. *International Journal of Food Microbiology, CRC Press* 86(1), pp. 87-89.
- Arnaud, F. (1980). Polinización asistida en las plantaciones de palma aceitera. *Palmas*, Editorial Universidad Estatal a Distancia. 1(1), 35-38.
- Asociacion Nacional de Exportadores de Cacao-Ecuador. (2005). *Anecacao*. Recuperado 20 de Noviembre 2017, de: <http://www.anecacao.com/es/quienes-somos/historia-del-cacao.html>
- Baford, A. S., Hagen, M., & Borchsenius, F. (2011). *Twenty-five years of progress in understanding pollination mechanisms in palms (Arecaceae)*. *Springer Annals of Botany*, 108(8), pp.1503–1516.
- Banco Central del Ecuador. (2017). *Datos estadísticos de exportación de Cacao*. Recuperado 10 de Noviembre, 2017, de

<https://www.bce.fin.ec/index.php/component/k2/item/327-ver-bolet%C3%ADn-anuario-por-a%C3%B1os>

- Barba, J., & Baquero, Y. (2012). *HIBRIDOS OxG OBTENIDOS A PARTIR DE OLEIFERAS TAISHA-PALMAR DEL RIO (PDR) – ECUADOR VARIEDAD – PDR (TAISHA x AVROS)*. El Coca: Palmar del Río.
- Batista, L. (2009). *Guía Técnica, El Cultivo de Cacao* (Primera Edición ed.). Punta Cana, República Dominicana: CEDAF.
- Bedoussac, L., Journet, E., Hauggaard-Nielsen, H., & Corre-Hellou, C. (2007). *Ecological principles underlying the increase of (Unica edición ed.)*. Roskilde, Isla de Selandia, Dinamarca: CRC PRESS.
- Borror, D., Triplehorn, C., & Johnson, N. (1989). *Introduction to the Study of Insects* (Unica Edición ed.). Springfield, USA: Saunders College Publishers.
- Braudeau, J. (1970). *El cacao, Traducido por A. Hernandez*. (Unica Edición ed.). Barcelona, España. Blumé.
- Bravo, V., & Bernal, G. (2015). PRINCIPALES PROBLEMAS fitosanitarios de la palma aceitera en la región amazónica del Ecuador. Mossaico. Revista Palma Ecuador 28(3), pp. 24-27.
- Burgos, R. (2013). ECUADOR PAÍS PALMICULTOR. Mossaico. Revista Palma Ecuador, 23(4), pp. 34-45.
- Camu N, De Winter T, Takrama J, Bernaet H y De Vyust L. (2007). *Dynamics and Biodiversity of Populations of Lactic Acid Bacteria and Acetic Acid Bacteria Involved in Spontaneous Heap Fermentation of Cocoa Beans in Ghana. APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY*, 8(1), pp. 1809-1824
- Caudwell, R. (2002). Polinización con insectos en palma de aceite ¿Es el momento para evaluar la viabilidad a largo plazo y la sostenibilidad del *Elaeidobius kamerunicus*? Mossaico. Revista Palmas, 23(1), pp. 17-25.
- Chavez, J., Tuxill, J., & Jarvis, I. (2004). Manejo de la diversidad de los cultivos en los sistemas agrotradicionales (Unica Edición ed.). Cali Colombia: Instituto Internacional de recursos fitogeneticos.
- Chinchilla , C., & Richardson, D. (1991). Situación actual de los insectos polinizadores y la polinización en palma aceitera en Centro América. Mossaico, *ASD Oil Palm Papers*, 7(2), pp. 1-18.
- Chinchilla, C., Escalante, M., & Richardson, D. (1990). Polinización en Palma Aceitera (*Elaeis Guineensis* Jacq.) en Centroamérica II. *CRC Press*. Comportamiento de Insectos. Turrialba, 40(4), pp. 461-470.

- Cleenwerck, I., Gonzalez, A., Camu, N., Engelbeen, K., De Vos, P., & De Vuyst, L. (2008). *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* (Primera Edición ed.). Ghent, Belgica: Universidad de Salamanca.
- Cleenwerck, Gonzalez, Camu, Engelbeen, De Vos y De Vuyst. (2008). *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* (Primera Edición ed.). Ghent, Belgica: Universidad de Salamanca.
- Compañía nacional de chocolates S.A.S. (2012). *El Cultivo de Cacao* (Primera Edición ed.). Medellín: Propia.
- Cordero, A. (2003). POTENCIALIDAD EXPORTADORA DEL CACAO PRODUCIDO EN EL DEPARTAMENTO DE BOLIVAR HACIA EL MERCADO JAPONES (Unica Edición ed.). CARTAGENA DE INDIAS, COLOMBIA ESCUELA DE CIENCIAS ECONÓMICAS Y ADMINISTRATIVAS.
- Cros, Mermet, Jeanjean, y Georges. (1994). *Relation précurseurs-développement de L'arôme Cacao*. Springer-Verlag, *Cocoa Producer's Alliance*, 7(3), pp. 723-726..
- Daniel, H. M., Vrancken, G., Takrama, J. F., Camu, N., De Vos, P., & De Vuyst, L. (2009). *Moosaico. Yeast diversity of Ghanaian cocoa bean heap fermentations*. *FEMS Yeast Research*, 15(5) pp. 774-783.
- Dostert, N., Roque, J., Cano, A., La Torre, M., & Weigend, M. (2017). Hoja Botánica: Cacao. Recuperado 25 de Noviembre 2017, de: http://www.botconsult.com/downloads/Hoja_Botanica_Cacao_2012.pdf
- E., G., & P., A. (1989). *El Cultivo del Cacao* (Primera Edición ed.). San Jose, Costa Rica: Editorial universidad a Distancia.
- Ecuacocoa. (2000). Estudio del cacao. Recuperado 26 Noviembre, 2017, de: http://www.ecuacocoa.com/espanol/index.php?option=com_content&task=view&id=12&Itemid=51
- Enriquez. (1985). *Curso sobre el cultivo del cacao* (Unica Edición ed.). San José, Costa Rica: Angrinter Agriss Foo.
- Enriquez. (2010). *Cacao Organico. Guia para productores Ecuatorianos*. (Unica Edición ed.). Quito, Ecuador, INIAP.
- Fedapal. (2016). *Estadísticas*. Recuperado 21 Noviembre, 2017, de: <http://fedapal.com/web/#>
- Federación Nacional de Cacaoteros. (2003). *Guia Tecnica para el cultivo de Cacao* (Unica Edición ed.). Bogota, Colombia, Pronatta.
- Forsyth, W., & Quesnel, V. (1963). *Mechanism of cocoa curing*. *CRC Press, Adv. Enzymol*, 25(7), pp. 457- 492.

- Fowler, M. (2009). Cocoa beans: de Tree to Factory. *Blackwell Science*, 21(4), pp. 50-70.
- Fundesyram. (2006). *INICIATIVAS COMUNITARIAS PARA AFRONTAR EL CAMBIO CLIMÁTICO*. Recuperado 22 Noviembre, 2017, de: <http://www.fundesyram.info/>
- Galindo, E. (2008). Probabilidad y Estadística para Ingenierías (Sexta Edición ed.). Mexico, Mexico: PEARSON EDUCACION.
- García-Armisen, Papalexandratou, Hendryckx, Camu, Vrancken, De Vuyust, y Cornelis . (2010). *Diversity of total bacterial Community associated with Ghanaian and Brazilian cocoa*. *Mossaico, Applied Microbiology*, 21(7), pp. 2281-2292.
- Genty, P. (1985). Polinización entomófila de la palma africana. *Revista Palmas Universidad de Ciencias Agrarias*, 6(3), pp. 90-101.
- Greenberg, S., Sétamou, M., Sappington, T., Liu, T., Coleman, R., & Armstrong, J. (2005). *Temperature-dependent development and reproduction of the boll weevil (Coleoptera: Curculionidae)*. *Insect Science, CABI*, 12(1), pp. 449-459 .
- Hacienda La Cabaña. (2009). Polinización Asistida en material E.o x E.g. Bogota, Colombia, Hacienda La Cabaña.
- Hala, N., Tuo, Y., Akpesse, A., Koua, H., & Tano, Y. (2012). *Entomofauna of Oil Palm Tree Inflorescences at La Mé Experimental Station (Côte d'Ivoire)*. *American Journal of Experimental Agriculture, Experimental Station*, 2(3), pp. 306-319.
- Hansen, C., del Olmo, M., & Burri, C. (1998). *Enzyme activities in cocoa beans during fermentation*. *Journal of the Science of Food and Agriculture. Wiley Blackwell*, 21(7), pp. 273-281.
- Henderson, A. (1986). *A Review of Pollination Studies in the Palmae*. *The Botanical Review, Mossaico*, 53(3), pp. 221-259.
- Ho, V., Zhao, J., & Fleet, G. (2014). *Yeasts are essential for cocoa bean fermentation*. *International Journal of Food Microbiology CRC Press*, 4(1), pp. 72-87.
- Hormaza, P., Forero, D., Ruiz, R., & Romero, H. (2010). Fenología de la palma de aceite africana (*Elaeis guineensis* Jacq.) y el híbrido interespecífico (*Elaeis oleifera* (Kunt) Cortes x *Elaeis guineensis* Jacq.). Bogotá, Colombia.: Cenipalma.
- IICA. (2017). Recuperado 23 Noviembre, 2017, de: <http://orton.catie.ac.cr/REPDOC/A7704E/A7704E.PDF>

- INIAP. (2012). Cultivos de Cacao tienen mayor producción con nueva semilla. *El Telegrafo*, 19(2), pp. 72-87.
- Irie, G., Zahouli, S., Tagro, G., Monke, F., Ban-Koffi, L., & Gnopo Nemli, J. (2010). *Effect of Drying Methods on the Chequimal Quality Traits of Coca Raw Materia*. *Advance Journal of Food Science and Technology*, Interscience Publisher, 25(4), pp. 184-190.
- Jianjun, Y., Zhen, Y., Cheng, B., Zetan, C., Weifu, L., & Fangzhen, J. (2015). *Pollination activity of Elaeidobius kamerunicus (Coleoptera: Curculionoidea) on oil palm on Hainan island*. *Cambridge University Press Florida Entomologist*, 9(2), pp. 499-505.
- Jimenez, J. (2017). Efecto del pre-secado sobre el porcentaje de fermentación y calidad sensorial del licor de cacao (Única Edición ed.). Machala, Ecuador, Universidad Técnica de Machala.
- Kirejtshuk, A., & Couturier, G. (2010). *Sap beetles of the tribe Mystropini (Coleoptera: Nitidulidae) associated with South American palm inflorescences*. *Annales de la Société entomologique de France (N.S.): International Journal of Entomology*, CRC Press, 46(3-4), pp. 367-421.
- Kurtzman, Fell y Boekhout. (2011). *Yeasts a Taxonomic Study* (Quinta Edición ed.). Amsterdam, Alemania, ELSEVIER.
- Labarca, M., & Narváez, Z. (2009). Identificación y fluctuación poblacional de insectos polinizadores en palma aceitera (*Elaeis guineensis* Jacquin) en el sur del lago de Maracaibo, estado Zulia, Venezuela. *Rev. Fac. Agron. (LUZ) Mossaico*, 26, pp. 305-324.
- Lagunes-Gálvez, S. (2006). *Isolement et caractérisation de bactéries acétiques provenant de la fermentation du cacao*. (Tercera Edición ed.). Montpellier, Italia, Université de Montpellier II.
- Lahtinen, S., Salminen, S., Von Wright, C., & Von Wrigth, A. (2010). *Lactic Acid Bacteria* (Cuarta Edición ed.). Boca Raton, London, New York, USA, CRC Press.
- Larrea, M. (2017). El Cultivo de Cacao Nacional: Un Bosque Generoso. Recuperado 24 Noviembre, 2017, Flacsoandes Libros Digitales de: <http://www.flacsoandes.edu.ec/libros/digital/43804.pdf>
- Loli, O., & Cavero, J. (2011). Fertilización y post cosecha de cacao (Única Edición ed.). Juanjui- Tarapoto- Peru: Banco Agrario.
- Louise, C., Amblard, P., & de Franqueville, H. (2007). Investigaciones nvestigaciones dirigidas dirigidas por el cirad sobre las enfermedades del complejo pudrición del cogollo de la palma aceitera en Latinoamérica. *Revista Palmas, CIRAD*, 28(1), pp. 345-362

- Lutheran World Relief. (2013). *CacaoMovil*. Recuperado 26 Noviembre, 2017 de: <http://cacaomovil.com/>
- Meléndez, M., & Ponce, W. (2016). *Pollination in the oil palms *Elaeis guineensis*, *E. oleifera* and their hybrids (OxG), in tropical America. *Pesquisa Agropecuaria Tropical, CAB International*, 46(1), pp. 102-110.*
- Minifie, B. (1989). *Chocolate, Cocoa, and Confectionery. Science and Technology, Third Edition, Van Nostrand Reinhold*, 3(1), pp. 104.
- Mondragón, V., & Roa, J. (1985). CENSO DE ENTOMOFAUNA NATIVA ASOCIADA CON INFLORESCENCIAS MASCULINAS Y FEMENINAS Y ANALISIS DE POLINIZACION EN PALMA AFRICANA (*Elaeis guineensis* Jacq.) PALMA AMERICANA (*Elaeis melanococca*) E HIBRIDO INTERESPECIFICO (*E. guineensis* x *E. melanococca*) EN COLOM. *Revista Palmas, Mossaico*, 1(1), pp. 44-69.
- Naranjo, F. (2013). Publicaciones de Fedepalma y Cenipalma en otros medios. *Revista Palma*, 39(1), pp. 13-22.
- Nielsen D, Teniola O, Ban-Koffi I, Owusu M, Andersson T y Holzapfel W. (2007). *The microbiology of Ghanaian cocoa fermentations analysed using culture-dependent and culture-independent methods. International Journal of Food Microbiology, CRC Press*, 10(1), pp. 168-186.
- Nielsen, D., Yoon, S., Yuan, C., Kristala, L., & Prather, P. (2010). *Chocolate, Cocoa, and Confectionery. Science and Technology Biotechnology Journal, Van Nostrand REinhold*, 15(2), pp. 274-284.
- Núñez, L., Bernal, R., & Knudsen, J. (2005). *Diurnal palm pollination by mystropine beetles: is it weather-related? Plant Systematics and Evolution, CRC Press*, 2(254), pp. 149–171.
- Ohene, E., Quao, J., Simpson, A., Takrama, J., & Kwesi, F. (2011). *Effect of pulp preconditioning on acidification, proteolysis, sugars and free fatty acids concentration during fermentation of coca (*Theobroma Cacao*) beans. International Journal of food Sciences and Nutrition, Wiley Blackwel*, 62(7), pp. 755-764
- Ortiz, L., Graziani, L., & Rovedas, G. (2009). Influencia de varios factores sobre características del grano de cacao fermentado y secado al sol. *Agronomía Tropical, Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas de Venezuela*, 2(59), pp. 119-127.
- Ostovar y Keeney. (1973). *Isolation and characterization of microorganisms involved in the fermentation of Trinidad's cacao beans. J. Food Sci., CRC Press*, 38(6), pp. 611-617
- Paz y Cepeda . (2011). LA ÉPOCA CACAOTERA EN ECUADOR. *HISTORIA Y ECONOMÍA*, Guayaquil, Ecuador, Corporación Editora Nacional.

- Pettipher. (1986). *Analysis of coca pulp and the formulation of a standardized artificial coca pulp medium. Journal of the Science of Food and Agriculture Mossaico*, 1(37), pp. 297-309
- Ponnamma , K. (2000). *Diurnal variation in the population of Elaeidobius kamerunicus on the anthesising male inflorescences of oil palm. Palmas, Incorporated Society of Planters*, 21(3), pp. 35-38
- Prada, M., Molina, D., Villarroel, D., Barrios, R., & Díaz, A. (1998). EFECTIVIDAD DE DOS ESPECIES DEL GÉNERO *Elaeidobius* (COLEOPTERA: CURCULIONIDAE) COMO POLINIZADORES EN PALMA ACEITERA. *Bioagro, CEPLAC*, 10(1), pp. 3-10.
- Prasetyo, A., Purba, W., & Susanto, A. (2014). *Elaeidobius kamerunicus: APPLICATION OF HATCH AND CARRY TECHNIQUE FOR INCREASING OIL PALM FRUIT SET. Journal of Oil Palm Research Blackwell Science*, 26(3), pp. 195-202
- Quiroz, J. (1994). Caracterización fenotípica del Cacao Nacional en Ecuador. (Primera Edición ed.). Guayaquil, Ecuador, Pichilingue: INIAP.
- Ravelomanana, Guiraud, Vincent y Galzy. (1984). *Étude de la flore de levures de la fermentation traditionnelle du cacao a Madagascar. Revue Des Fermentations et des Industries Alimentaries, Comision Internacional de Levaduras*, 39(4), pp. 104-106
- Rosero, G., & Santacruz, L. (2014). Efecto de la polinización asistida en medio líquido en la conformación del racimo en material híbrido OxG en la conformación del racimo en material híbrido OxG en la plantación Guaicaramo S.A. *Revista Palmas, Mossaico*, 35(4), pp. 11-19
- Rubio, J. (2013). Analizar y Validar un Programa de Rehabilitación en la Poscosecha del Cacao CCN51, en la Finca Rami, en la Provincia de Los Ríos (Primera Edición ed.). Los Ríos, Ecuador, ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DEL LITORAL.
- 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 coca beans. Lebensmittel-Wissenschaft und Technologie CRC Press*, 18(2), pp. 69-75.
- Sánchez, E., Salamanca, J., Calvache, H., Ortiz, L., & Rivera, D. (2004.). Evaluación de poblaciones de polinizadores y su relación con la formación de racimos en la zona de Tumaco, Colombia. *Palmas, Fedepalma*, 5(1), pp. 84-92.
- Sanchez, M. G., Bisbal, F., Ramon, D., & Martinez, P. (2008). *Mycobiota and mycotoxin producing fungi de cocoa beans. beans. International Journal of Food Microbiology., Fedepalma*, 125(8), pp. 336-340

- Schwan. (1998). *Cocoa Fermentations Conducted with a Defined Microbial Cocktail Inoculum*. American Society of Microbiology, CRC Press, 64(4), pp. 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, CRC Press, 79(5), pp. 96-107
- Schwan y Wheals. (2004). *The Microbiology of Cocoa Fermentation and its Role in Chocolate Quality*. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, CRC Press, 44(4), pp. 205-221
- Shaposhnikova. (1952). Cambios de la acidez y de los hidratos de carbono durante el crecimiento y maduración de las frutas de cacao. Agronomía Tropical, FICA, 2(1), pp. 83-90.
- Sigcha, L., & Herrera, A. (2012). PLAN DE DESARROLLO Y ORDENAMIENTO TERRITORIAL DE LA PARROQUIA ANTONIO SOTOMAYOR. MANCOMUNIDAD DE MUNICIPIOS PARA EL MANEJO SOSTENIBLE DEL HUMEDAL ABRAS DE MANTEQUILLA, Incorporated Society of Planters, 25(12), pp. 25-30.
- Slazar, D., Villafuerte, D., Cuichán, M., Orbe, D., & Márquez, J. (2016). Encuesta de Superficie y Producción Agropecuaria Continua ESPAC 2016 (Primera Edición ed.). Guayaquil, Ecuador: INEC.
- Spichinger, R. (1990). Contribución a la flora de la Amazonia peruana: los árboles del Arboletum Jenaro Herrera, Volume 2 (Segunda Edición ed.). Quito, Ecuador, Conservatoire et Jardin Botaniques de Genève, 1990.
- Suomalainen, H., & Lehtonen, M. (1979). *The production of aroma compounds*. Journal Institute Brew, Mossaico, 85(6), pp. 149-156
- Syed, R. (1979). *Studies on oil palm pollination by insects*. Bulletin of Entomological Research, Incorporated Society of Planters, 69(2), pp. 213-224
- Syed, R. (1984). Los polinizadores de la palma africana. Revista Palmas, Incorporated Society of Planters, 3(1), pp. 19-64
- Syed, R., & Saleh, A. (1988). POBLACION DEL E. KAMERUNICUS FAUST EN RELACION CON LA CONFORMACION DEL RACIMO. Revista Palmas, Incorporated Society of Planters, 9(2), pp. 29-33
- Teixeira, M. (2013). *Approach and Advances of the Program of Genetic Improvement of the Oil Palm in Embrapa*. Revista Palmas, CIFFOR, 34(1), pp. 168-173

- Teo, T. (2015). *Effectiveness of the oil palm pollinating weevil, *Elaeidobius kamerunicus*, in Malaysia*. *UTAR Agriculture Science Journal*, NIAS Press, 1(4), pp. 40-43
- Thompson, S., Miller, K., & Lopez, A. (2013). *Cocoa and Coffee*. In: M.P. Doyle, L.R. Beuchat and T.J. Montville. *Food Microbiology: Fundamentals and Frontiers*, CRC Press, 20(4), pp. 35-38.
- Thomsen, M., Hauggaard-Nielsen, H., Petersson, A., & Thomsen, A. (2007). *Sustainable bioethanol production combining biorefinery principles and intercropping strategies*. *Forskningscenter Risoe, Dinamarca: Riso National Laboratory*.
- Tuo, Y., Koua, H., & Hala, N. (2011). *Biology of *Elaeidobius Kamerunicus* and *Elaeidobius Plagiatus* (Coleoptera: Curculionidae) Main Pollinators of Oil Palm in West Africa*. *European Journal of Scientific Research*, Mossete, 49(3), pp. 426-432.
- Turner, P., & Gillbanks, R. (1974). *Oil palm cultivation and management (Segunda Edición ed.)*. *Kuala Lumpur, Malaysia, Incorporated Society of Planters*.
- Vicepresidencia del Ecuador. (2015). *Diagnostico de la Cadena Productiva del Cacao en el Ecuador (Primera Edición ed.)*. Quito: Vicepresidencia del Ecuador.
- Wacher, M. (2011). *Revista Digital Universitaria*. Recuperado 21 Diciembre, 2017, de: <http://www.revista.unam.mx/vol.12/num4/art42/#up>
- Yue, J., Yan, Z., Bai, C., Chen, Z., Lin, W., & Jiao, F. (2015). *Pollination Activity of *Elaeidobius kamerunicus* (Coleoptera: Curculionoidea) on Oil Palm on Hainan Island*. *Florida Entomologist*, Cambridge University Press, 98(2), pp. 499-505

