



UTMACH

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y DE LA SALUD

CARRERA DE ALIMENTOS

Aplicación de procesos fermentativos para la reducción del amargor de las almendras de cacao fino de aroma (*Theobroma cacao* L.)

**MONTAÑO CALI MANUEL ROGELIO
INGENIERO EN ALIMENTOS**

**CASTILLO MACAS JENNIFER PAOLA
INGENIERA EN ALIMENTOS**

**MACHALA
2023**



UTMACH

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y DE LA SALUD

CARRERA DE ALIMENTOS

**Aplicación de procesos fermentativos para la reducción del amargor
de las almendras de cacao fino de aroma (*Theobroma cacao* L.)**

**MONTAÑO CALI MANUEL ROGELIO
INGENIERO EN ALIMENTOS**

**CASTILLO MACAS JENNIFER PAOLA
INGENIERA EN ALIMENTOS**

**MACHALA
2023**



UTMACH

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y DE LA SALUD

CARRERA DE ALIMENTOS

TRABAJOS EXPERIMENTALES

**Aplicación de procesos fermentativos para la reducción del
amargor de las almendras de cacao fino de aroma (Theobroma
cacao L.)**

**MONTAÑO CALI MANUEL ROGELIO
INGENIERO EN ALIMENTOS**

**CASTILLO MACAS JENNIFER PAOLA
INGENIERA EN ALIMENTOS**

AYALA ARMIJOS JOSE HUMBERTO

**MACHALA
2023**

APLICACIÓN DE PROCESOS FERMENTATIVOS PARA LA REDUCCIÓN DEL AMARGOR DE LAS ALMENDRAS DE CACAO FINO DE AROMA (*Theobroma cacao* L.)

por Jennifer Paola Castillo Macas Manuel Rogelio Montaña Cali

Fecha de entrega: 28-nov-2023 09:27p.m. (UTC-0500)

Identificador de la entrega: 2178849413

Nombre del archivo: Jennifer_Paola_Castillo_Macas_-_Manuel_Rogelio_Monta_o_Cali.pdf (1.7M)

Total de palabras: 13899

Total de caracteres: 82824

APLICACIÓN DE PROCESOS FERMENTATIVOS PARA LA REDUCCIÓN DEL AMARGOR DE LAS ALMENDRAS DE CACAO FINO DE AROMA (Theobroma cacao L.)

INFORME DE ORIGINALIDAD

9%

INDICE DE SIMILITUD

9%

FUENTES DE INTERNET

3%

PUBLICACIONES

2%

TRABAJOS DEL ESTUDIANTE

FUENTES PRIMARIAS

1 "Efecto de la adición integrada de un extracto de coronta de maíz morado (Zea mays L.) obtenido mediante extracción con líquidos calientes presurizados sobre el contenido de contaminantes neoformados en galletas saladas", Pontificia Universidad Católica de Chile, 2023
Publicación <1%

2 Submitted to Pontificia Universidad Católica del Ecuador - PUCE
Trabajo del estudiante <1%

3 repositorio.lamolina.edu.pe
Fuente de Internet <1%

4 hdl.handle.net
Fuente de Internet <1%

5 repositorio.ucsg.edu.ec
Fuente de Internet <1%

repositorio.uteq.edu.ec

CLÁUSULA DE CESIÓN DE DERECHO DE PUBLICACIÓN EN EL REPOSITORIO DIGITAL INSTITUCIONAL

Los que suscriben, MONTAÑO CALI MANUEL ROGELIO y CASTILLO MACAS JENNIFER PAOLA, en calidad de autores del siguiente trabajo escrito titulado Aplicación de procesos fermentativos para la reducción del amargor de las almendras de cacao fino de aroma (*Theobroma cacao* L.), otorgan a la Universidad Técnica de Machala, de forma gratuita y no exclusiva, los derechos de reproducción, distribución y comunicación pública de la obra, que constituye un trabajo de autoría propia, sobre la cual tienen potestad para otorgar los derechos contenidos en esta licencia.

Los autores declaran que el contenido que se publicará es de carácter académico y se enmarca en las disposiciones definidas por la Universidad Técnica de Machala.

Se autoriza a transformar la obra, únicamente cuando sea necesario, y a realizar las adaptaciones pertinentes para permitir su preservación, distribución y publicación en el Repositorio Digital Institucional de la Universidad Técnica de Machala.

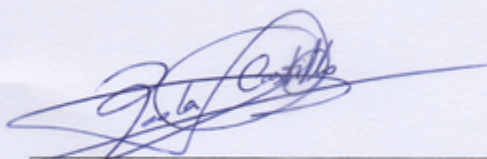
Los autores como garantes de la autoría de la obra y en relación a la misma, declaran que la universidad se encuentra libre de todo tipo de responsabilidad sobre el contenido de la obra y que asumen la responsabilidad frente a cualquier reclamo o demanda por parte de terceros de manera exclusiva.

Aceptando esta licencia, se cede a la Universidad Técnica de Machala el derecho exclusivo de archivar, reproducir, convertir, comunicar y/o distribuir la obra mundialmente en formato electrónico y digital a través de su Repositorio Digital Institucional, siempre y cuando no se lo haga para obtener beneficio económico.



MONTAÑO CALI MANUEL ROGELIO

0750701799



CASTILLO MACAS JENNIFER PAOLA

0750562621

AGRADECIMIENTO

Primeramente, a Dios por permitirnos terminar nuestra carrera universitaria con éxito. A nuestros seres queridos por el incondicional apoyo durante la carrera y el proceso de tesis, su paciencia y amor nos mantuvo motivados. A nuestros tutores académicos, Ing. Humberto Ayala y Ing. Fabián Cuenca por su orientación, paciencia y apoyo a lo largo de este trabajo de titulación. También a nuestros amigos y compañeros de clase, quienes no solo compartieron sus conocimientos, sino que también brindaron un ambiente amigable que hizo que este proceso fuera más llevadero.

Este logro no hubiera sido posible sin el apoyo de todos ustedes. Cada uno dejó una marca imborrable en este trabajo y en nuestra formación académica.

¡Muchas gracias!

Atentamente, Jennifer y Rogelio.

RESUMEN

En el presente trabajo de investigación se analizaron las propiedades físico-químicas del cacao fino de aroma (*Theobroma cacao L.*), como son el pH, sólidos solubles, acidez, azúcares reductores, ácido láctico y contenido de fenoles totales, donde se tomaron datos diariamente. Así mismo, se aplicaron tres tipos de fermentaciones, fermentación espontánea o natural, donde no se adicionó ningún tipo de microorganismo o sustrato, fermentación láctica, aquí se adicionó lactosuero dulce que proviene de la elaboración de quesos, y por último, la fermentación alcohólica – láctica, donde, se adicionó melaza y cuajo porcino natural, esto con el fin de observar el comportamiento de cada tipo de fermentación y sustrato adicionado, para lograr reducir el amargor de las almendras de cacao.

Además, se cuantificó los polifenoles totales durante el proceso fermentativo y después del secado y tostado, con el método de Folin-Ciocalteu, tomando en cuenta que el contenido polifenólico, es el componente principal del amargor y astringencia en las semillas de cacao y actúan de manera indirecta en el aroma. Luego del proceso de secado y tostado en almendras de cacao sin fermentar fue 660,28 mg/L, fermentación espontánea 650,57 mg/L, en la fermentación láctica 507,06 mg/L, y, por último, en la fermentación alcohólica – láctica fue de 484,14 mg/L, como se puede observar cada fermentación reduce el contenido de polifenoles, debido al efecto de calor proporcionado durante el secado y tostado. Dando como mejor resultado la fermentación alcohólica – láctica tras disminuir los polifenoles totales a 484,14 mg/L, logrando que el amargor se reduzca.

Posteriormente, mediante evaluación sensorial con una escala de 0 a 5, se estableció el mejor tipo de fermentación para la reducción del amargor en almendras de cacao fino en aroma, donde, el cacao sin fermentar tuvo una puntuación de 4,3, fermentación espontánea 3,1, fermentación láctica 3,2 y por último a la fermentación alcohólica – láctica tiene una puntuación de amargor de 3, resultando esta fermentación con menos puntaje, asumiendo que es la que menos amargor se percibió, además, esto coincide con el contenido de polifenoles totales que después del secado y tostado, es el que menor contenido polifenólico contiene.

Palabras claves: *fermentación, amargor, polifenoles, almendras de cacao, reducir.*

ABSTRACT

This research work analyzed the physicochemical properties of fine aroma cocoa (*Theobroma cacao* L.), such as pH, soluble solids, acidity, reducing sugars, lactic acid and total phenol content, where data were taken daily. Likewise, three types of fermentation were applied: spontaneous or natural fermentation, where no type of microorganism or substrate was added; lactic fermentation, where sweet whey from cheese production was added; and finally, lactic fermentation, where sweet whey from cheese production was added, and finally, the alcoholic - lactic fermentation, where molasses and natural pork rennet were added, in order to observe the behavior of each type of fermentation and substrate added, to reduce the bitterness of the cocoa almonds.

In addition, total polyphenols were quantified during the fermentation process and after drying and roasting, with the Folin-Ciocalteu method, taking into account that the polyphenolic content is the main component of bitterness and astringency in cocoa beans and acts indirectly in the aroma. After the drying and roasting process in unfermented cocoa beans was 660,28 mg/L, spontaneous fermentation 650,57 mg/L, in lactic fermentation 507,06 mg/L, and, finally, in alcoholic - lactic fermentation was 484,14 mg/L, as can be observed each fermentation reduces the polyphenol content, due to the heat effect provided during drying and roasting. The best result was obtained in the alcoholic-lactic fermentation after reducing the total polyphenols to 484,14 mg/L, reducing bitterness.

Subsequently, by means of sensory evaluation with a scale of 0 to 5, the best type of fermentation for the reduction of bitterness in fine cocoa beans in aroma was established, where, unfermented cocoa had a score of 4,3, spontaneous fermentation 3,1, lactic fermentation 3,2 and finally the alcoholic - lactic fermentation has a bitterness score of 3, resulting in this fermentation with the lowest score, assuming that it is the least bitterness was perceived, in addition, this coincides with the total polyphenol content that after drying and roasting, is the lowest polyphenolic content contains.

Key words: *fermentation, bitterness, polyphenols, cocoa almonds, reduce.*

INDICE GENERAL

RESUMEN	3
ABSTRACT	4
INTRODUCCIÓN	9
PROBLEMA Y JUSTIFICACIÓN	11
OBJETIVOS	13
Objetivo General.....	13
Objetivos Específicos	13
MARCO TEÓRICO	14
1.1 Producción de cacao en Ecuador	14
1.2 Cacao (<i>Theobroma cacao</i> L.).....	14
1.3 Variedades de cacao.....	15
1.3.1 Cacao fino de aroma	15
1.3.2 Cacao criollo	15
1.3.3 Cacao trinitario	15
1.3.4 Cacao a granel	15
1.3.4.1 Cacao forastero	15
1.4 Taxonomía del cacao.....	15
1.5 Composición físico-química del grano de cacao.....	16
1.6 Componentes precursores del amargor.....	16
1.6.1 Polifenoles totales	16
1.6.2 Alcaloides.....	17
1.7 Melaza.....	18
1.7.1 Composición química.....	18
1.8 Suero láctico	18
1.8.1 Composición química.....	19
1.9 Cuajo porcino natural	19
1.10 Proceso productivo	19
1.10.1 Mucílago de cacao	19
1.10.2 Proceso de fermentación	20
1.10.2.1 Fermentación anaeróbica	20
1.10.2.1 Fermentación aeróbica	21
1.10.3 Secado	21
1.10.4 Tostado.....	22
METODOLOGÍA.....	23

2.1	Materia prima	23
2.2	Ubicación de la investigación.....	23
2.3	Diseño de experimento	23
2.3.1	Definición de variables.....	23
2.3.2	Planteamiento de Hipótesis.....	23
2.3.3	Análisis estadístico	24
2.4	Preparación de muestra.....	24
2.5	Análisis químicos de las almendras de cacao.	24
2.5.1	Determinación de pH.....	24
2.5.2	Determinación de Sólidos Solubles (°Brix).....	24
2.5.3	Determinación de Acidez	25
2.5.3.1	Preparación de hidróxido de sodio al 0,1 N.....	25
2.5.3.1	Fórmula de porcentaje de acidez	25
2.5.4	Determinación de contenido fenólico total.....	26
2.5.4.1	Metodología para elaborar la curva patrón de ácido gálico	26
2.5.5	Determinación de ácido láctico.....	27
2.5.5.1	Metodología para elaborar la curva patrón de ácido láctico	27
2.5.6	Determinación de azúcares reductores	28
2.5.6.1	Preparación del reactivo DNS	28
2.5.6.2	Metodología para elaborar la curva patrón de sacarosa.....	28
2.6	Diagrama de flujo	29
2.6.1	Descripción del proceso.....	30
2.7	Análisis sensorial.....	31
2.7.1	Preparación de chocolate para el análisis sensorial	31
	RESULTADOS	32
3.1	Caracterización físico-química de cacao	32
3.1.1	Sólidos Solubles	32
3.1.2	pH.....	34
3.1.3	Azúcares reductores	36
3.1.4	Acidez.....	38
3.1.5	Polifenoles totales	39
3.1.6	Ácido láctico	41
3.1.7	Análisis sensorial	42
	CONCLUSIONES	44
	RECOMENDACIONES.....	45
	BIBLIOGRAFIA	46
	ANEXOS	52

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Taxonomía del cacao nacional fino de aroma.....	17
Tabla 2. Composición química del grano fresco, después del proceso fermentativo y secado de cacao.....	17
Tabla 3. Composición química de melaza	19
Tabla 4. Composición química de suero láctico	20
Tabla 5. Diseño experimental	24
Tabla 6. Análisis de varianza del contenido de solidos solubles	34
Tabla 7. Análisis de varianza con respecto al pH	36
Tabla 8. Análisis de varianza del contenido de azúcares reductores	38
Tabla 9. Análisis de varianza del contenido de acidez.....	39
Tabla 10. Análisis de varianza del contenido fenoles totales durante la fermentación.....	41
Tabla 11. Análisis de varianza del contenido fenoles totales después del secado y tostado...	41
Tabla 12. Análisis de varianza del contenido de ácido láctico durante la fermentación.....	43
Tabla 13. Análisis de varianza del análisis sensorial	43
Tabla 14. Prueba de Tukey con respecto a los tipos de fermentación	44

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Planta de cacao nacional fino de aroma	15
Figura 2. Cacao nacional fino de aroma	16
Figura 3. Curva de calibración de ácido gálico.....	27
Figura 4. Curva de calibración de ácido láctico.....	28
Figura 5. Curva de calibración de sacarosa	30
Figura 6. Proceso de elaboración	30
Figura 7. Hoja de análisis sensorial	32
Figura 8. Azúcares fermentables durante la F. espontánea, F. láctica y F. alcohólica-láctica de los granos de cacao.	33
Figura 9. Azúcares fermentables durante la F. acética, F. láctica y F. acética-láctica de los granos de cacao.	34
Figura 10. Comportamiento del pH durante la F. espontánea, F. láctica y F. alcohólica-láctica de las almendras de cacao.	35
Figura 11. Comportamiento del pH durante la F. acética, F. láctica y F. acética-láctica de las almendras de cacao.	35
Figura 12. Comportamiento de los azúcares reductores durante la F. espontánea, F. láctica y F. alcohólica - láctica de las almendras de cacao.....	37
Figura 13. Comportamiento de los azúcares reductores durante la F. acética, F. láctica y F. acética-láctica de las almendras de cacao.	37
Figura 14. Comportamiento de la acidez durante la F. acética, F. láctica y F. acética-láctica de las almendras de cacao.....	39
Figura 15. Comportamiento de los Polifenoles Totales durante la F. acética, F. láctica y F. acética-láctica de las almendras de cacao.	40
Figura 16. Comportamiento del Ácido Láctico durante la F. acética, F. láctica y F. acética-láctica de las almendras de cacao.....	42
Figura 17. Análisis sensorial.....	43

INTRODUCCIÓN

El cacao (*Theobroma cacao* L.) es un cultivo de gran importancia socioeconómica en Ecuador, porque establece una fuente de ingresos para muchas familias; asimismo, el país se encuentra en tercer lugar de las exportaciones mundiales, favoreciendo con el 6 % de la producción mundial de semillas de cacao (Cuenca-Cuenca et al., 2019).

El cacao que se produce en Ecuador supera el 60 % de aroma fino; no obstante, los rendimientos son menores a 0,25 toneladas por hectárea por año, debido a la ausencia de manejo tecnológico en fincas, factores climáticos, factores fisicoquímicos del suelo, uso de clones de bajo rendimiento genético, escasez o abundamiento de fertilización que favorece elocuentemente a la disminución del rendimiento (Vivar & Arturo, 2016).

La excelencia de las semillas de cacao se establece a partir de la cantidad y tipo de los componentes volátiles que contienen (Kongor et al., 2016). En el transcurso de la fermentación, se producen componentes que se utilizarán como base para los aromas característicos y sustancias favorables presentes en el chocolate y sus derivados (Cevallos-Cevallos et al., 2018). Además, contribuye en la reducción de la sensación de amargura y astringencia, dando lugar a los primeros indicios de aroma y sabor característico del chocolate. Adicionalmente, se originan péptidos y aminoácidos que intervienen como antecesores en la formación de las notas aromáticas (Caligiani et al., 2016).

Las almendras de cacao se encuentran envueltas en una pulpa dulce y viscosa, que puede tener características ácidas y aromáticas. No obstante, les falta la cantidad adecuada de sustancias previo al desarrollo de compuestos volátiles que resulten en un producto final con un alto nivel de aroma deseado. La fermentación de las almendras de cacao es un paso esencial en el que se desencadenan una serie de procesos bioquímicos, enzimáticos y microbiológicos. Estas reacciones conducen a la generación de compuestos volátiles esenciales, como alcoholes y ésteres, junto con las sustancias precursoras en sabor y aroma, como azúcares reductores, péptidos libres y aminoácidos (Castro-Alayo et al., 2019). Los polifenoles y alcaloides son responsables de los sabores amargos y astringentes, estos se liberan de las almendras de cacao. El desarrollo del sabor se da durante la fase de secado, y da como resultado el característico color rojizo de los granos. La acidez y astringencia reducen a medida que se disminuyen los niveles de ácidos volátiles y la cantidad total de polifenoles. De acuerdo con Crafac et al., (2014) manifiesta la presencia de azúcares reductores y péptidos en la fase de producción del chocolate fomenta la reacción de Maillard, dando lugar a compuestos intermedios como

furanos, aldehídos, cetonas, pirroles y otros compuestos volátiles; estos componentes desempeñan un papel fundamental en la creación del perfil de aroma distintivo tanto del cacao como del producto final, es decir, el chocolate.

El presente trabajo tiene como objetivo reducir la sensación de amargor en los granos de cacao fino de aroma aplicando diferentes tipos de fermentaciones: fermentación espontánea, fermentación láctica, y fermentación alcohólica - láctica para obtener el mejor prototipo de fermentación para la disminución del amargor.

PROBLEMA Y JUSTIFICACIÓN

El cacao es un alimento de la cultura de las poblaciones indoamericanas presente desde la edad prehispánica hasta la actualidad. El progreso productivo y su empleo en industrias ha sido de interés investigativo y comercial que reside como base para la elaboración de chocolates en sus variadas formas y composiciones, convirtiéndose así en uno de los productos más transados a nivel global.

Las almendras de cacao fino aroma contienen alto contenido de polifenoles (15 % peso seco) y alcaloides en un 4 %, estas sustancias son contribuyentes clave en la creación del sabor y aroma característico. Los polifenoles son responsables de proporcionar sensación de amargura y astringencia, además de contribuir a los aromas afrutados de las almendras del mismo, por otra parte, los alcaloides también conceden amargor y están implicados en la palatabilidad de los alimentos. La cantidad de dichos componentes pueden variar en las almendras del cacao, por varios factores, ya sea por aspectos genéticos o ambientales, por lo cual; en su biosíntesis pueden impactar en su trazabilidad a nivel biotecnológico como es la regulación de la expresión de genes o alterando las condiciones que perjudican esas rutas de biosíntesis y así obtener cacaos con particularidades que sean más deseables, tanto por el consumidor como para la industria. El contenido de alcaloides va disminuyendo durante las etapas del proceso inicial, lo que resulta en un equilibrio adecuado de amargura deseada en el cacao fino de aromatostado (Aprotosoie et al., 2016).

El cacao fino de aroma desarrolla especialmente atributos sensoriales, para el cual debe haber un correcto proceso fermentativo, para así desarrollar los atributos del sabor característico. De acuerdo a varias investigaciones una problemática de gran interés en la fabricación de chocolate es, que no se aplican otros procesos fermentativos para mejorar la calidad organoléptica del mismo; es por esto que se forma un excedente del sabor amargo y un bajo contenido de aromas en las almendras del cacao. Si el amargor es muy prominente se logrará percibir otros sabores y perturbarán negativamente la apreciación total del chocolate. Además, la sensación del amargor varía entre los consumidores, tomando en cuenta que algunos consumidores pueden disfrutar de un chocolate más amargo, mientras que otros prefieren un sabor suave y menos amargo. Un dato importante es que las industrias chocolateras disfrazan el amargor mediante el excesivo incremento de sacarosa que puede ser hasta el 40 % (Carrillo et al., 2014).

Las diversas alteraciones que se dan en el mucílago y las almendras de cacao, tienen como resultado una potente proliferación y actividad de microorganismos, las cuales otorgan cambios bioquímicos dentro de las almendras de cacao que favorecen a la disminución del amargor y astringencia, pero también provoca la manifestación de diversos compuestos volátiles apreciados como índices de la calidad del grano. Sin embargo, las enzimas endógenas que poseen las almendras de cacao, cuando son activadas tienen un rol primordial en el desarrollo de compuestos relacionados con el sabor y aroma (Ortega & Elias, 2015).

El desarrollo de trabajo de esta investigación se centra en la reducción en el perfil de amargor de las almendras de cacao fino de aroma (*Theobroma cacao L.*) en el proceso de fermentación, con el propósito de mejorar su calidad.

Esto también incide en la mejora de las almendras del cacao durante la fase de fermentación que ofrecerá tanto a las industrias fermentadoras como a los agricultores, en hallar otros métodos de mejorar el producto final (chocolate) mediante el uso de enzimas, sustratos y bacterias en el transcurso de fermentación de las almendras de cacao.

OBJETIVOS

Objetivo General

Aplicar procesos fermentativos para la reducción del amargor en las almendras de cacao fino de aroma (*Theobroma cacao L.*).

Objetivos Específicos

- Caracterizar las propiedades físico-química del cacao fino de aroma (*Theobroma cacao L.*).
- Cuantificar los polifenoles totales al aplicar la fermentación espontánea, fermentación láctica, fermentación alcohólica – láctica.
- Establecer mediante evaluación sensorial el mejor proceso de fermentación para la reducción del amargor de las almendras de cacao fino de aroma.

MARCO TEÓRICO

1.1 Producción de cacao en Ecuador

Se lo conoce como parte de los principales productores del mundo de cacao fino en aroma. Ecuador en el año 2015 llegó a exportar 236 667 toneladas de granos de cacao donde predominaba la calidad de aroma fino en un 70 % de la cantidad exportada. De manera internacional a este tipo de cacao se lo denomina como el mejor debido a sus características organolépticas por esta razón es usado para elaboración chocolates tipo gourmets. Es de alta demanda en países europeos por este grano debido a sus precedentes (Intriago et al., 2018).

En la provincia de el Oro se lleva a cabo la producción de diferentes tipos de cacao por su diversidad climática y pisos altitudinales. Para el Ecuador reporta el 7,2 % total de producción (Unda & Carrillo, 2017).



Figura 1. Planta de cacao nacional fino de aroma

1.2 Cacao (*Theobroma cacao* L.)

Esta especie es originaria de las zonas tropicales como es la amazonia de Sudamérica. La zona está conformada por el triángulo amazónico donde Colombia, Ecuador y Perú describen esta área (López et al., 2020).

La planta de cacao puede alcanzar alturas de 5 - 8 metros. Las hojas son de forma lanceoladas, en tanto sus pequeñas flores de esta planta se encuentran en las partes maduras del tallo y rama. Su fruto se lo denomina como mazorca y dentro de este es posible hallar 20 o más semillas en color violeta y blanco (López Medina & Gil Rivero, 2017).



Figura 2. Cacao fino de aroma

1.3 Variedades de cacao

1.3.1 Cacao fino de aroma

Este tipo de cacao donde su mazorca es de color amarillo y las semillas poseen un nivel alto de aroma, pero bajo contenido de taninos, y se distingue de otras variedades por su aroma inimitable y sabor característico, que son elementos esenciales para la producción de un chocolate excepcional (Velásquez et al., 2020).

1.3.2 Cacao criollo

Es una variedad de cacao que se desarrolla en ambientes semisilvestres, donde los árboles son de crecimiento moderado y menos resistentes a enfermedades y plagas, en comparación con el cacao Forastero. No obstante, el fruto es reconocido por su dulzura y es ideal para la producción de un chocolate menos amargo (Morales et al., 2015).

1.3.3 Cacao trinitario

Es una variedad híbrida que es el resultado de la combinación de la variedad Criollo y Forastero, posee la capacidad de adaptarse a diversas áreas tropicales, es resistente a plagas y enfermedades, y su perfil de sabor se destaca por presentar matices de astringencia y acidez (Romero & Urrego, 2016).

1.3.4 Cacao a granel

1.3.4.1 Cacao forastero

Esta variedad se destaca por su amargor y bajo contenido de ácidos, sin embargo, se cultiva ampliamente debido a su mayor producción y capacidad de resistir a plagas (Gutiérrez-Ríos et al., 2022)

1.4 Taxonomía del cacao

Según Montes Mosquera, (2016) la taxonomía del cacao, lo especifica en la Tabla 1:

Tabla 1. Taxonomía del cacao nacional fino de aroma

Taxonomía del cacao	
Nombre científico	Theobroma cacao
Reino	Plantea
División	Magnoliophyta
Clase	Magnoliopsida
Orden	Malvales
Familia	Malvaceae
Género	<i>Theobroma</i>
Especie	<i>Theobroma cacao L.</i>

1.5 Composición físico-química del grano de cacao

La almendra del cacao está formada en gran parte por manteca de cacao, que constituye la mitad de su peso total. Su composición química se describe en la tabla 2 y el resultado de las almendras de cacao posterior a su fermentación y secado su composición. Su composición química se detalla en la tabla 3. Es importante tener en cuenta el resultado que detalla la composición del grano de cacao variará de acuerdo con el tipo de grano, su calidad de fermentación, secado y posteriores procesos aplicados (Ludisaca, 2017).

Tabla 2. Composición química del grano fresco, después del proceso fermentativo y secado de cacao

Componente	Grano fresco	Después del proceso fermentativo y secado
Manteca de cacao	30 % - 32 %	54 %
Proteína	10 % - 15 %	11.5 %
Celulosa	2 % - 3 %	9 %
Almidón	4 % - 6 %	7.50 %
Hidratos de carbono	12 % - 14 %	10.5 %
Agua	32 % - 39 %	5 %
Ácidos orgánicos	9.5 %	2 %
Polifenoles	5 % - 6 %	1 %
Teobromina	1 % - 2 %	0.20 %

Fuente: (Villamil, 2019; Ludisaca, 2017).

1.6 Componentes precursores del amargor

1.6.1 Polifenoles totales

Las semillas de cacao poseen una cantidad significativa de polifenoles (cerca del 15 % del peso en almendras de cacao secas) similares al de las verduras, vino y té. Los polifenoles se encuentran dentro de las «células poli fenólicas», que son células del parénquima de

los cotiledones, estos componentes otorgan sensaciones amargas y astringentes (Loja Atariguana & Montesdeoca Loja, 2022).

Los polifenoles presentes en las almendras de cacao se dividen en tres grupos distintos, las catequinas o flavonoides (37 %); las antocianinas (4 %) y las proantocianidinas el 58 %. Dentro de las catequinas, la epicatequina es la única partícula que compone el grupo (98 % del total de catequinas), aunque la proantocianidina es el principal componente fenólico mayoritario en semillas de cacao.

Los compuestos fenólicos forman parte de un extenso grupo de sustancias, estimados como no esenciales para la conservación de las plantas « metabolitos secundarios », a pesar de esto, otorgan actividades en las estructuras químicas, porque perciben más de 8000 componentes diferentes. Sin embargo, los polifenoles están involucrados con la calidad de los alimentos derivado de vegetales, ya que su pigmento contribuye a la coloración de los alimentos, por ejemplo, las antocianinas otorgan colores rojos, azules, violetas, naranjas y purpuras en frutos o en vegetales y es aquí donde el cacao ha demostrado su contenido de polifenoles y poder antioxidante. Así mismo, los polifenoles, especialmente las proantocianidinas son relacionadas con la sensación astringente que presenta el cacao. En el transcurso del proceso de las almendras de cacao se produce una pérdida significativa de flavonoides (desde el 100 % al 10 % en el chocolate). Por lo tanto, los polifenoles impulsan procesos bioquímicos que contribuyen a la generación del sabor y color de cacao (Vázquez-Ovando et al., 2016).

1.6.2 Alcaloides

Los granos de cacao poseen alcaloides como las metilxantinas (4 %), cafeína (0,2 %), teobromina principal alcaloide del cacao, y por último la teofilina que se encuentra en forma de trazas, sin embargo, el contenido estos compuestos varían según el tipo de cacao. Del mismo modo, confieren en el amargor del cacao, e interceden en la palatabilidad de los alimentos que lo contienen (Loja Atariguana & Montesdeoca Loja, 2022).

Las almendras de cacao deben el amargo en mayor proporción a los alcaloides presentes, aunque no exclusivamente, ya que se ha evidenciado, que otros elementos de naturaleza diferente a alcaloides (dicetopiperazinas, L-aminoácidos libres o péptidos) también contribuyen a la percepción del amargor, o que pueden crear confusión en la percepción entre los atributos de amargo-astringente (taninos de bajo peso molecular como epicatequina, catequina, procianidinas). El contenido de los alcaloides durante la fase de fermentación se ve reducido dando a las almendras luego de ser tostadas el balance apropiado de amargor deseable en cacaos finos. Posteriormente de las 72 horas de fermentación el contenido de metilxantinas disminuye progresivamente lo que conlleva a una disminución del amargor de alrededor del 30

% de su contenido inicial.

La pérdida de teobromina fluctúa entre el 30 % hasta un 40 % y la cafeína se reduce a más del 50 %, esto debido a la propagación de los alcaloides desde los cotiledones. Durante el tostado la cafeína y teobromina constituyen aductos junto con dicetopiperazinas que proveen el amargor en los granos tostados.

Así mismo, la teobromina, la cafeína y la teofilina son los alcaloides principales responsables del amargor de las almendras y de la palatabilidad de los productos elaborados a partir de las almendras de cacao (Vázquez-Ovando et al., 2016).

1.7 Melaza

Es un subproducto que se obtiene de la caña en el transcurso del proceso de refinamiento de la sacarosa y representa un contenido de azúcares totales alrededor del 50 %, además incluye elementos traza y vitaminas (tiamina, riboflavina, piridoxina y niacinamida). El líquido es espeso y viscoso de tono oscuro prácticamente negro, y mientras más oscura sea, más sabor y nutrientes contiene (Rincón Santamaría et al., 2019).

1.7.1 Composición química

Tabla 3. Composición química de melaza

Componente	Porcentaje
Proteína	3 %
Sacarosa	60 % - 63 %
Azúcares reductores	3 % - 5 %
Grasas	0,4 %
Cenizas	9 %
Agua	16 %
Compuestos nitrogenados	2,5 % - 4,5 %

Fuente: (Aguilar et al., 2015).

1.8 Suero láctico

Este líquido se obtiene durante la elaboración de quesos, cuando la proteína de la leche, conocida como caseína, coagula debido a la acción de enzimas coagulantes como la quimosina, o mediante la adición de ácidos orgánicos como el ácido cítrico. Este proceso se lleva a cabo hasta alcanzar el punto isoeléctrico de la caseína (Puente & Fernando, 2017).

Existen dos tipos de sueros que se clasifican en suero dulce y suero ácido, en el presente trabajo se utilizó el suero dulce que se obtuvo mediante la coagulación enzimática de la proteína de la

leche, mediante la acción de enzima coagulante (quimosina) y que tiene un pH de 6,5 – 6,8, utilizando el cuajo comercial.

1.8.1 Composición química

Tabla 4. Composición química de suero láctico

Componente	Concentración (g/L)
Proteína	6 - 12
Lactosa	46 - 65
Solidos totales	63 - 70
Grasas	3 - 5

Fuente: (Mazorra-Manzano & Moreno-Hernández, 2019).

1.9 Cuajo porcino natural

Generan sustancias como pepsina y quimotripsina, estas están en una zona denominada cuajar ubicado entre el estómago y el principio del intestino delgado. Estas enzimas dan paso a la coagulación de la leche y son importantes en la producción de quesos naturales (Alvites Quispe, 2022).

Según lo citado por, Ramos & Gretel, (2019) Whitaker menciona acerca de los cuajos y su obtención por medio de la mucosa que se produce en el estómago del cerdo. La sustancia « pepsinógeno» es auto-catalítica porque se transforma en pepsina, esta es purificada y luego utilizada en la elaboración de quesos.

Según Estremadoyro et al., (2015) es su investigación señala sobre la secreción gástrica de cerdos están presente tres enzimas, siendo la pepsina una enzima proteolítica de más importancia, esta se libera en forma de pepsinógeno y se ubica en el medio ácido del estómago, desempeñando un rol importante en la digestión de proteínas.

1.10 Proceso productivo

1.10.1 Mucílago de cacao

Tejido blanco y viscoso de color blanco que envuelve los granos de cacao, además esta pulpa de es de sabor dulce y ácido. Este tejido cumple una función esencial durante el proceso de fermentación, y su composición ocupa un papel importante en determinar el resultado de dicho proceso (Afoakwa, 2016). Esta constituido mayormente por 82 - 87 % en agua, un contenido de azúcar de 10 - 15 %, alrededor de 2 a 3 % de pentosanos, su cantidad ácido cítrico oscila de 1- 3 %, y una proporción de pectina que va desde 1 a 1,5 %. Las características del mucílago

hacen que sean un medio ventajoso para el desarrollo microbiano. También se encuentran componentes en menor proporción como son las proteínas, aminoácidos, minerales y vitaminas (vitamina C). En la descomposición el mucílago implica la participación de una variedad diversa de microorganismos, como son levaduras, BAL, BAA, bacterias esporuladas y hongos (Papalexandratou et al., 2013).

1.10.2 Proceso de fermentación

Según Penagos Muñetón, (2019), el proceso de fermentación ocurre debido a una interacción de naturaleza compleja entre los componentes iniciales, una variedad de microorganismos distintos y los productos metabólicos que generan. Aquí se toman en consideración diferentes elementos como: el cultivo de esta planta, la práctica que lleve el agricultor durante el proceso, las condiciones del clima, y el estado de las mazorcas de acuerdo a su maduración. La pulpa en una cantidad suficiente asegura un buen proceso de fermentación.

La forma de reconocer la madurez se da por medio del color, olor o también el sonido. De acuerdo con el tipo de cacao el cambio de color característico para reconocer la madurez es de violeta a rojo- naranja o verde a amarillo. También es posible notar la madurez por su aroma agradable característico, además agitando el fruto se podrá escuchar los granos golpeando en su interior. El contenido de pulpa en el fruto sobre maduro presenta una notoria disminución, con apariencia de estar deshidratada, además es posible hallar almendras germinadas deterioradas. La pulpa en las mazorcas inmaduras es más espesa y adherida al grano.

Durante los procesos fermentativos de granos de cacao, se han registrado la presencia de levaduras *Saccharomyces cerevisiae*, *Hanseniaspora guilliermondii*, *Kluyveromyces marxianus*, *Pichia kudriavzevii*, además de (BAL) *Lactobacillus plantarum* y *Lactobacillus fermentum*, así como bacterias del ácido acético *Acetobacter pasteurianus*, *acetobacter aceti*, junto a otras como *Bacillus cereus*, *B. pumilis*, *B subtilis* (Visintin et al., 2016).

1.10.2.1 Fermentación anaeróbica

La duración de esta fase va desde 24 a 48 horas, la pulpa que envuelve el grano de cacao posee en cantidades significativas azúcares especialmente glucosa, fructosa y sacarosa. Acompañado de un pH aproximado de 3,6 forman condiciones idóneas para el desarrollo de las levaduras como: *saccharomyces cerevisiae*, *Hanseniaspora opuntiae*, *Kluyveromyces marxianus*, *Pichia kluyveri* y *Pichia kudriavzevii* (Hamdouche et al., 2019). El apretado espacio formado entre pulpa/almendras de cacao, acompañado de la actividad metabólicas de levaduras forman condiciones anaeróbicas. Esto da paso a las levaduras a degradar los azúcares presentes en la

pulpa en alcohol, en especial el etanol. Adicionalmente, secretan pectinasa provocando una mayor descomposición de la pulpa, generando el drenaje de un líquido denominado «sudor», disminuyendo la viscosidad y facilitando el acceso de aire a la masa de fermentación (De Vuyst & Weckx, 2016).

P.kluuyeri genera altas cantidades de esterres con un aroma afrutado. Por otro lado, las especies pertenecientes a *pichia*, *cándida* y bacterias lácticas heterofermentativas consumen el ácido cítrico adicionalmente, generando un ligero aumento del pH en la pulpa, en conjunto el incremento de la tensión de oxígeno promueve el desarrollo de las bacterias ácido-lácticas BAL (Crafack et al., 2013).

La generación de dióxido de carbono durante la fermentación facilita el desarrollo de las BAL provenientes de las levaduras, producto de la autólisis celular. Después del período de 24 horas, las especies predominantes son *Lactobacillus plantarum* y *Lactobacillus fermentum*. Gran parte de las BAL durante el proceso de fermentación utilizan la glucosa por vía Embden–Meyerhorf, produciendo el 85 % del ácido láctico (Gutiérrez-Ríos et al., 2022).

1.10.2.1 Fermentación aeróbica

En la creciente licuefacción, provoca la disminución de pulpa, incrementando el nivel de aire y temperatura interna de la masa de fermentación. Con el entorno aeróbico las bacterias del ácido acético podemos encontrar *Acetobacter aceti* y *Glucobacter oxidants*, inician el dominio de esta fase (De Vuyst & Leroy, 2020).

El ácido acético es parte de los principales metabolitos generados a través de una reacción exotérmica que comienza con la oxidación del etanol y el ácido láctico por bacterias acidificantes, alcanzando temperaturas por encima de los 48 – 50 ° C. La absorción del ácido acético en las almendras ocurre una vez que las almendras se han hinchado y el micropilo se ha abierto (Lieberei et al., 2013).

La dispersión de etanol y ácido acético en las almendras causa la muerte del embrión. como resultado, desencadena una actividad interna debido a la lisis en paredes y membranas de las células que son cruciales para la generación de compuestos precursores del sabor, como son los aminoácidos libres, azúcares reductores y péptidos. Estos compuestos se someten a modificaciones posteriores a través de procesos como la degradación de Strecker y la reacción de Maillard en el transcurso del secado y tostado (Hernández-Hernández et al., 2016).

1.10.3 Secado

Después de la fermentación, la humedad del grano es de 55 %, para poder almacenarlos y llevarlo al siguiente proceso, estos granos deben secarse alcanzando una humedad del 6 – 8 %

(Caligiani et al., 2016; Giacometti et al., 2015). En el curso de este proceso, continúan sucediendo reacciones oxidativas asociada a la fermentación (Kongor et al., 2016). El método más frecuente empleado para el secado es por exposición a la luz solar, esto provoca el desarrollo e intensificación de sabores en producto final (Barrientos et al., 2019; Predan et al., 2019), en este caso, se lo procesa a secar durante el tiempo de 12 a 20 días para llegar al contenido de humedad ideal. En el caso de áreas donde la disponibilidad de luz es irregular, se emplea el secado artificial como secadores mecánicos a temperaturas de 60 °C – 70 °C. La merma de peso mediante el proceso de secado es aproximadamente a 2/3 del peso original del grano fresco (Hartel et al., 2017).

A lo largo del secado, el contenido los polifenoles totales y proteínas traspasan a ser aminoácidos libres o llegan a desnaturalizarse en su totalidad (Alean et al., 2016). Lo mismo ocurre con la teobromina y cafeína, disminuyen durante el secado. Con respecto al ácido láctico, este se pierde, pero el ácido acético se mantiene, es por eso, la necesidad de garantizar las condiciones favorables durante la fermentación y secado para no producir un excedente de ácidos (Deus et al., 2018).

1.10.4 Tostado

Según Lau & Jimena, (2020) el proceso de tostado es una operación fundamental en el progreso del sabor y aroma distintivo del chocolate. Tiene como objetivo, el lograr un oscurecimiento en el color, facilita el desprendimiento de la cáscara y alcanzar una textura óptima para romper el grano. Las almendras de cacao secas se calientan a temperaturas, comprendidas entre 110 °C - 160 °C (Rojas S et al., 2020).

Durante el tostado ocurren reacciones químicas importantes que modifican la composición de las almendras de cacao, como son las reacciones de Maillard, el cual consiste en un grupo de reacciones que se producen cuando el alimento es calentado e involucran la interacción entre las proteínas y azúcares, dando paso a la formación de aromas y sabores. Así mismo, también ocurre la caramelización de los azúcares, que se produce durante el calentamiento de los carbohidratos (sacarosa y azúcares reductores) y los azúcares se deshidratan debido a las altas temperaturas del tostado formando furfural y sus derivados (Gutiérrez, 2017). También ocurren diversos comportamientos como, lipólisis oxidativa y degradación oxidativa de los polifenoles totales (Oracz & Nebesny, 2019).

METODOLOGÍA

2.1 Materia prima

Se utilizó cacao nacional fino en aroma, esta especie de cacao es muy diferente desde su crecimiento ya que presenta una coloración verde, es de aspecto rugoso y cuando está totalmente maduro alcanza una tonalidad amarilla. El cacao se cosechó en una finca de Pajonal.

2.2 Ubicación de la investigación

Este estudio se dio lugar en el Laboratorio de Bioconversión de la Facultad de Ciencias Químicas y de la Salud, perteneciente a la Universidad Técnica de Machala.

2.3 Diseño de experimento

Para establecer el experimento que logre reducir el amargor del cacao fino de aroma se aplicaron 3 experimentos los cuales consistieron: fermentación espontánea se fermento únicamente almendras de cacao, fermentación láctica adicionando suero láctico y fermentación alcohólica – láctica con adición de melaza y cuajo porcino natural. Todo este proceso inicio con una fermentación anaerobia.

Tabla 5. Diseño experimental

	F.		
Condiciones	Espontanea	F. Láctica	F. Alcohólica – Láctica
Tiempo	9	9	9
°Brix	15	15	15
pH	3,9	3,9	3,9

2.3.1 Definición de variables

El diseño experimental cuenta con variables independientes (tiempo y tipo de fermentación), variables dependientes (pH, solidos solubles, acidez titulable, contenido fenólico, azúcares reductores, contenido de ácido láctico), y variable de respuesta (amargor).

2.3.2 Planteamiento de Hipótesis

H₀: no es posible reducir el sabor amargo de las almendras de cacao fino de aroma, mediante la aplicación de procesos fermentativos.

H₁: es posible reducir el sabor amargo de las almendras de cacao fino de aroma, mediante la aplicación de procesos fermentativos.

2.3.3 Análisis estadístico

Los datos obtenidos en cuanto a los diferentes tipos de fermentación se analizaron estadísticamente mediante un análisis de varianza unidireccional (ANOVA), para analizar si los diferentes procesos de fermentación presentan diferencias significativas, donde el valor $p \geq 0,05$ fue considerado como diferencia significativa, usando el programa Origin 50.

2.4 Preparación de muestra.

Se cosecharon las mazorcas que se encuentren en el índice de madurez adecuado, se partieron y se obtuvieron las almendras para luego ser desvenadas. Se realizaron dos partes experimentales, primero las almendras se las colocaron en biorreactores experimentales, obteniendo así 5 biorreactores con almendras de cacao, donde un biorreactor solo se colocaron las almendras de cacao que es la muestra patrón, aparte en dos biorreactores se colocaron las almendras de cacao con suero lácteo; y en otros dos biorreactores más se colocaron almendras de cacao con melaza y cuajo natural porcino, se colocaron una manguera con huecos en cada biorreactor para que las almendras se oxigenen por igual.

La melaza (82 °Brix) se preparó una dilución con agua potable hasta alcanzar los 15 °Brix y el cuajo animal se adicionó 200 ml.

2.5 Análisis químicos de las almendras de cacao.

La caracterización que se realizó a las almendras de cacao se ejecutó en el Laboratorio de Investigación y Bioconversión de la carrera de Alimentos, perteneciente a la Universidad Técnica de Machala. Los análisis que se le realizaron al mucílago de cacao fino de aroma son los siguientes: pH, sólidos solubles, acidez titulable, azúcares reductores, contenido fenólico total, y ácido láctico.

2.5.1 Determinación de pH

Para medir el pH en la muestra se aplicó la metodología de potenciómetro (pH Meter Starter 5000, Hong Kong, China), consiste en colocar 2 – 5 ml de líquido de la almendra de cacao con el mucilago el cual se produce por el proceso fermentativo y se coloca en un tubo de ensayo para hacer la lectura con el electrodo del pH- metro digital para luego proceder a leer el resultado obtenido (Gutierrez et al., 2022).

2.5.2 Determinación de Sólidos Solubles (°Brix)

Los sólidos solubles permiten determinar la cantidad de sacarosa en porcentaje que existe en la muestra, este tipo de análisis se realizó mediante el uso de un refractómetro digital (Biomed Instruments, Hong

Kong, China) el cual consiste en colocar una gota del líquido de la almendra de cacao en el prisma del refractómetro, para luego proceder a leer el resultado obtenido (Amorim Homem de Abreu Loureiro et al., 2017).

2.5.3 Determinación de Acidez

La acidez total se midió por el método volumétrico, tomando en cuenta el ácido cítrico, como ácido predominante. Para realizar esta medición se utiliza un matraz Erlenmeyer de 200 - 250 ml, se tomó 10 ml de muestra (líquido de la almendra de cacao) y se adiciona 3 gotas de reactivo de fenolftaleína, donde se homogeneiza bien y luego se llevó a cabo la titulación con NaOH a 0,1 N hasta obtener una coloración rosa suave u obtener un pH neutro de 7 (Núñez et al., 2021).

2.5.3.1 Preparación de hidróxido de sodio al 0,1 N

$$N = \frac{\#EQ}{L \text{ solución}}$$

$$0.1 N = \frac{\#EQ}{0,1 L}$$

$$\#EQ = 0,1 \cdot 0,1$$

$$\#EQ = 0,01$$

$$EQ = \frac{g \text{ NaOH}}{\text{masa de un eq} - g \text{ NaOH}}$$

$$0.01 = \frac{g \text{ NaOH}}{40 g \text{ NaOH}}$$

$$g \text{ NaOH} = (40g) (0,01)$$

$$g \text{ NaOH} = 0,4 g \text{ NaOH}$$

2.5.3.1 Fórmula de porcentaje de acidez

$$\% \text{ acidez} = B * N * K * 100/W$$

B: NaOH consumido en la titulación (ml)

N: normalidad del NaOH (N)

K: constante de acidez (ácido cítrico 0,064) (ácido láctico 0,09)

W: cantidad de muestra (ml)

2.5.4 Determinación de contenido fenólico total

Para la cuantificación del contenido fenólico total, se utilizó 50 µL de muestra para después ser combinado con 3 ml de agua destilada y 250 µL del reactivo Folin-Ciocalteu's al 1N. Se estabilizó durante 8 minutos. Luego se agregó 750 µL de carbonato de sodio al 20 % y 950 µL de agua destilada. Una vez obtenida esta solución, se dejó incubar durante 30 minutos a 24°C y se usó un espectrofotómetro UV/ (Shimadzu, UV mini – 1240, Buenos Aires, Argentina) para leer los resultados a 765 nm. Se preparó una gráfica de calibración de ácido gálico en concentraciones de 200 ppm, 400 ppm, 600 ppm, 800 ppm y 1000 ppm, disueltos en agua destilada (Ayala-Zavala et al., 2012; Zapata et al., 2013).

2.5.4.1 Metodología para elaborar la curva patrón de ácido gálico

Se utilizará la siguiente fórmula de dilución para determinar el volumen requerido y diluir la solución hasta alcanzar la concentración y volumen.

$$C1 * V1 = C2 * V2$$

C1= concentración inicial

C2 = concentración final

V1= volumen inicial

V2= volumen final

En primer lugar, se disolvió 1 g en 1000 ml de agua destilada en un balón volumétrico aforado, por otra parte, en 5 balones volumétricos de 100 ml o 50 ml, se coloca el volumen calculado (V1) de cada una de las concentraciones mencionadas anteriormente y luego aforar con agua destilada. Finalmente medir la absorbancia en un espectrofotómetro UV/VIS a 765 nm.

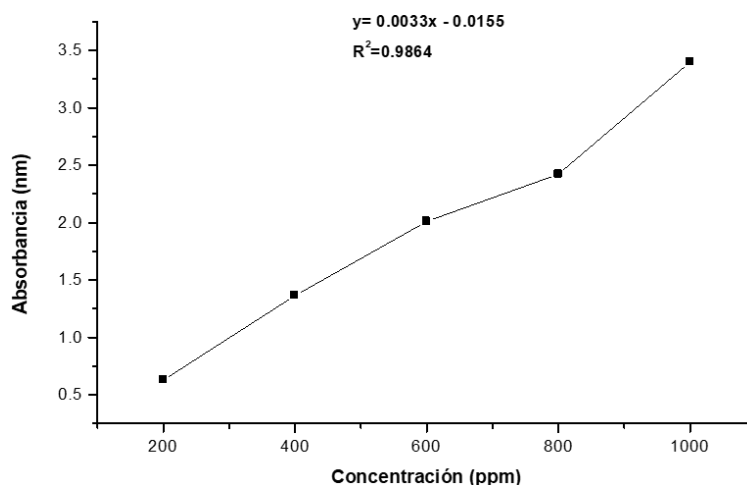


Figura 3. Curva de calibración de ácido gálico

2.5.5 Determinación de ácido láctico

Este método consiste en leer la absorbancia de la solución del ácido láctico 88 g/L a 300 nm a 500 nm el cual debe ser nula. En un tubo colocar 1 ml de muestra y adicionar 2ml de cloruro férrico al 0,2 %, luego colocarlo en un agitador de tubos (Vortex, Pointe-Claire, Canadá) a 1200 revoluciones por minuto, y obtener una correcta homogenización. Medir la absorbancia en el espectrofotómetro UV/VIS de 300 nm a 500 nm. Se preparó una gráfica de calibración de ácido láctico en concentraciones de 200 ppm, 400 ppm, 600 ppm, 800 ppm, disueltos en agua destilada (Torres & Gómez, 2019).

2.5.5.1 Metodología para elaborar la curva patrón de ácido láctico

Se utilizará la siguiente fórmula de dilución para determinar el volumen requerido y diluir la solución hasta alcanzar la concentración y volumen.

$$C1*V1 = C2*V2$$

C1= concentración inicial

C2 = concentración final

V1= volumen inicial

V2= volumen final

En primer lugar, se disolvió 88 g de ácido láctico en 1000 ml de agua destilada en un balón volumétrico aforado, por otra parte, en 5 balones volumétricos de 100 ml o 50 ml, se coloca el volumen calculado (V1) de cada una de las concentraciones mencionadas anteriormente y luego aforar con agua destilada. Finalmente medir la absorbancia en un espectrofotómetro UV/VIS a 365 nm.

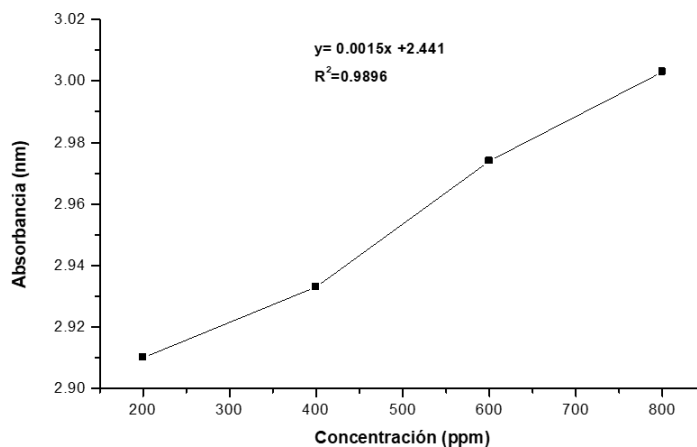


Figura 4. Curva de calibración de ácido láctico

2.5.6 Determinación de azúcares reductores

Se uso una centrifuga de marca (CLAY ADAMS Inc, Chatsworth, Estados Unidos), colocar las muestras por ocho minutos a 4000 rpm, se adicionaron 0,25 ml de muestra y 0,25 ml del reactivo DNS en tubos con tapa rosca y se colocaron en un baño termostático a 92 °C por cinco minutos. Se interrumpela reacción con enfriamiento en agua por cinco minutos y se agregan 2,5 ml de agua destilada por tubo; por último, se agita y se leen los resultados en espectrofotómetro UV-VIS a 540 nm. Se preparó una solución patrón de sacarosa en concentraciones: 200 ppm, 400 ppm, 600 ppm, 800 ppm, 1000 ppm, disueltos en agua destilada (Montañez, 2020).

2.5.6.1 Preparación del reactivo DNS

Pesar 1,6 g de NaOH, 43,8 g de tartrato de Na-K y 1 g de ácido 3,5-dinitrosalicílico. Agregar el NaOH a un vaso de precipitación con 50 ml de agua destilada y homogenizar completamente, luego se agrega el tartrato de Na-K suavemente hasta diluir por completo la solución mediante agitación magnética, agregar el ácido 3,5-dinitrosalicílico, protegiendo el reactivo de la luz con papel aluminio. A continuación, se afora la solución hasta 100 ml con agua destilada en un balón aforado de 100 ml y se deja en agitación toda la noche en un frasco ámbar (Montañez, 2020).

2.5.6.2 Metodología para elaborar la curva patrón de sacarosa

Se utilizará la siguiente formula de dilución para determinar el volumen requerido y diluir la solución hasta alcanzar la concentración y volumen.

$$C1*V1 = C2*V2$$

C1= concentración inicial

C2 = concentración final

V1= volumen inicial

V2= volumen final

En primer lugar, se disolvió 1 gramo de sacarosa en 1000 ml de agua destilada en un balón volumétrico aforado, por otra parte, en 5 balones volumétricos de 100 ml o 50 ml, se coloca el volumen calculado (V1) de cada una de las concentraciones mencionadas anteriormente y luego aforar con agua destilada. Finalmente medir la absorbancia en el espectrofotómetro UV/VIS a 540 nm.

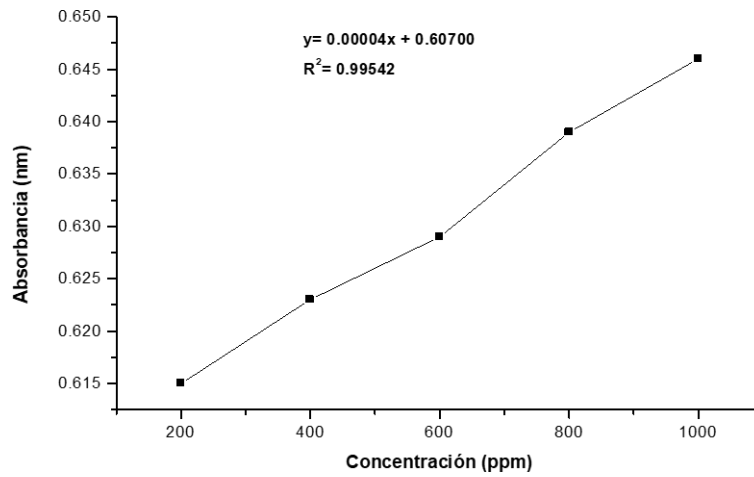


Figura 5. Curva de calibración de sacarosa

2.6 Diagrama de flujo

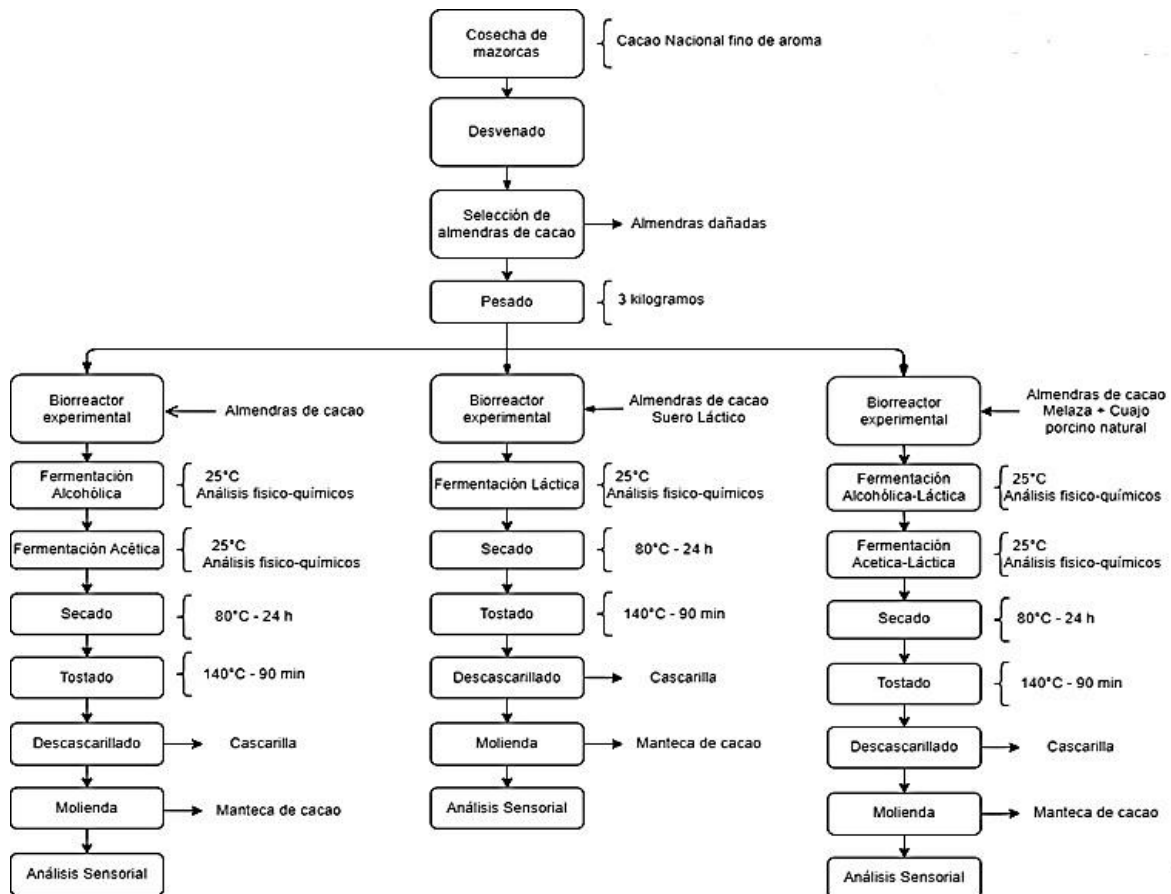


Figura 6. Proceso de elaboración

2.6.1 Descripción del proceso

Cosecha de mazorcas: se utilizó cacao fino en aroma, se almacena en condiciones óptimas para luego ser procesadas.

Desvenado: retirar las venas de las almendras de cacao.

Selección de almendras de cacao: eliminar las almendras que presenten daños físicos, o biológicos.

Pesado: se realizó el pesado de aproximadamente 3 kg para cada biorreactor.

Biorreactor experimental: se colocaron las almendras de cacao en biorreactores diferentes para los siguientes tratamientos: fermentación espontánea, fermentación con adición de suero láctico y fermentación con adición de melaza y cuajo natural porcino.

Fermentación alcohólica: se fermentaron las semillas de cacao dentro de biorreactores experimentales en condiciones anaerobias a 25 °C durante 5 – 6 días. Aquí se realizaron los análisis control: brix, pH, azúcares reductores, polifenoles.

Fermentación acética: una vez transcurridos los 5 – 6 días de fermentación alcohólica, sucede la fermentación acética donde las almendras de cacao se esparcen por bandejas de acero inoxidable para la fermentación acética en condiciones aeróbicas a 25 °C durante 5 - 6 días y se realizaron los análisis de control: Brix, acidez, pH, azúcares reductores, polifenoles.

Fermentación láctica: en el segundo tratamiento se produce la fermentación láctica añadiendo suero láctico y cuajo porcino natural, se realizaron los análisis antes mencionados.

Fermentación alcohólica - láctica: en el tercer tratamiento se produce la fermentación alcohólica – láctica debido a la adición de la melaza que contiene levaduras y el cuajo que contiene enzimas naturales, se realizaron los análisis antes mencionados.

Fermentación acética - láctica: esta fermentación se produce a partir del 6 día debido a que se termina la fermentación alcohólica y sucede la fermentación acética, se realizaron los análisis antes mencionados.

Secado: se realizó secado en estufa (MEMERT, República Federal de Alemania, Alemania), a temperaturas de 80 °C durante 24h para eliminar la humedad del grano para luego proceder a tostarlas.

Tostado: se realizó en un horno rotatorio experimental a 140 °C durante 90 minutos.

Descascarillado: se procedió a separar la cascara del grano para proceder a moler.

Molienda: antes de proceder a la molienda se calentaron los granos en la estufa a 50 °C durante 30 minutos para romper los glóbulos de grasa, luego se realizó el molido de las almendras de cacao en un extractor de aceite Xiushi Oil Press, (Wenling Xiushi Electrical CO., Ltd., Zhejiang,

China), para separar lamanteca de cacao.


Análisis sensorial: se efectuó el análisis sensorial de perfil de sabor a docentes y estudiantes.

2.7 Análisis sensorial


Para el desarrollo del análisis sensorial del chocolate se realizó a profesores y alumnos de la Universidad Técnica de Machala, donde se realizó la prueba de perfil de sabor que nos permite detectar cambios en el sabor del alimento que es evaluado, este tipo de análisis se utiliza para el desarrollo y mejora de sabores en diferentes tipos de productos para hacerlos más agradables al paladar del consumidor. Tomando en cuenta los atributos como dulce, amargo, acidez, astringente y aroma calificándolos en escala de 0 a 5, como se observa en la figura 7.

2.7.1 Preparación de chocolate para el análisis sensorial

Se realizó una dilución de 40 gramos de chocolate en 500 ml de agua potable; para proceder a cocción por 5 - 10 minutos a 80 °C.



**ANÁLISIS SENSORIAL
DE CACAO**
Ficha de Catadón



CATADOR _____

FECHA _____

Frente a usted se encuentra 3 muestras de CHOCOLATE, la cual debe probar describiendo las características presentes en la muestra.

Marque con una X sobre la casilla del término que mas describa lo que usted percibe por la muestra.

Atributos	111					
	0	1	2	3	4	5
Dulce						
Amargo						
Astringente						
Acidez						
Aroma						

Atributos	222					
	0	1	2	3	4	5
Dulce						
Amargo						
Astringente						
Acidez						
Aroma						

Atributos	333					
	0	1	2	3	4	5
Dulce						
Amargo						
Astringente						
Acidez						
Aroma						

ESCALA DE INTENSIDAD

0	1	2	3	4	5
---	---	---	---	---	---

Ausente Apenas detectable Moderado Presente Intenso Extremo

COMENTARIOS: _____

MUCHAS GRACIAS!

Figura 7. Hoja de análisis sensorial

RESULTADOS

3.1 Caracterización físico-química de cacao

3.1.1 Sólidos Solubles

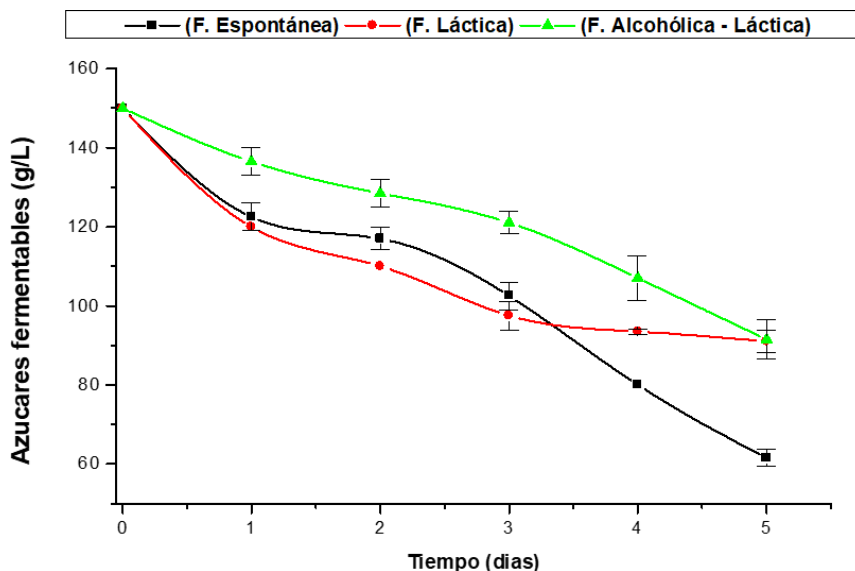


Figura 8. Azúcares fermentables durante la F. espontánea, F. láctica y F. alcohólica-láctica de los granos de cacao.

En la figura 8, con respecto a la fermentación espontánea durante los primeros 5 días, se observa una disminución considerable de los sólidos solubles, que fue desde 150 g/L hasta 61,5 g/L esto debido al agotamiento de los azúcares que son dextrosa, sacarosa y levulosa.

Correspondiente a la fermentación láctica (figura 8 y 9), los sólidos solubles disminuyen considerablemente desde el día 0 con un inicio de 150 g/L hasta llegar a 56,5 g/L, tomando en cuenta que el sustrato fue el suero láctico, esto se debe a que, tanto como las almendras del cacao y el suero láctico presentan cantidades y condiciones propicias para la generación de bacterias ácido-lácticas donde se fermentan la mayoría de azúcares fermentables. Según Norberto et al., (2018) fermentando la misma materia prima, obtuvo resultados similares explicando, que cuando existe un aumento del ácido láctico producido por las bacterias ácido-lácticas, hay un consumo de carbohidratos causado por microorganismos presentes, dando como resultado la depreciación del contenido de sólidos solubles y crecida de la acidez.

Posteriormente, durante fermentación alcohólica-láctica (figura 8), a medida que transcurre el tiempo existe una disminución de los sólidos solubles, empezando con 150 g/L hasta llegar a

91,5 g/L, debido a que los azúcares fermentables se degradan más rápido por el trabajo de las levaduras que posee la melaza y las enzimas naturales del cuajo.

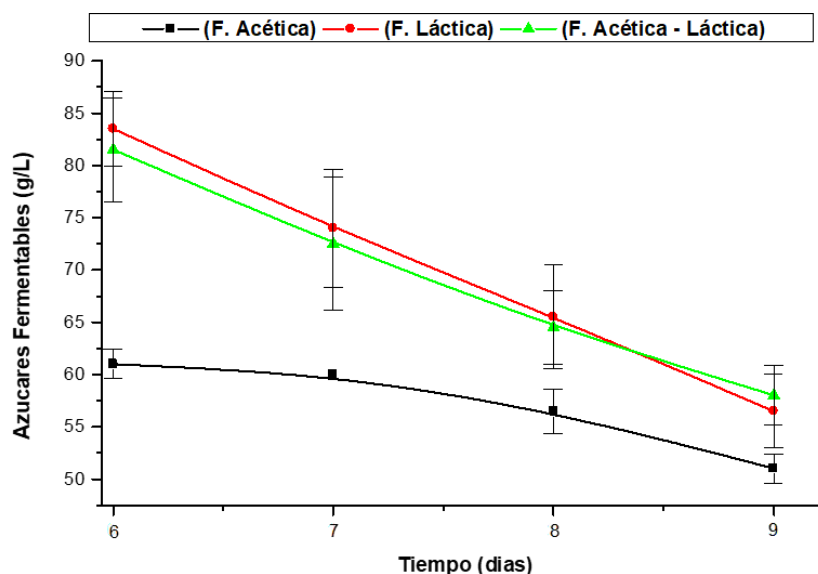


Figura 9. Azúcares fermentables durante la F. acética, F. láctica y F. acética-láctica de los granos de cacao.

Posteriormente, de transcurrir los 5 días de fermentación espontánea empezó la fermentación acética (figura 9) desde el día 6 hasta el día 9, donde los sólidos solubles siguen disminuyendo hasta llegar a 51 g/L, esto debido a transformación de azúcares solubles a etanol y CO₂. Hernández & del Pilar, (2018), en su investigación coincide en que los sólidos solubles totales disminuyen progresivamente y señala que los microorganismos presentes en las almendras de cacao metabolizan los sólidos en 76 % de los sólidos iniciales durante el proceso fermentativo anaeróbico.

En la fermentación acética - láctica (figura 9) el cual sigue los azúcares fermentables siguen disminuyendo y termina con 58 g/L. Ho et al., (2014), coincidió con la disminución de los azúcares, debido al agotamiento enorme de dextrosa, y que los azúcares que posee la pulpa se convirtieron en alcohol etílico y CO₂ por las levaduras y bacterias ácido-lácticas.

Tabla 6. Análisis de varianza del contenido de solidos solubles

Datos	Media	Varianza	N
F. Espontánea	86,65	1221,00278	10
F. Láctica	94,15	757,55833	10
F. Mixta	101,1	1035,26667	10
F = 0,51986			
p = 0,60043			

Los sólidos solubles, con respecto al tiempo según la estadística ($0,60 < 0,05$), no existe discrepancias estadísticas, en el contenido de solidos solubles durante los diez días del proceso de fermentación.

Amorim Homem de Abreu Loureiro et al., (2017) no obtuvieron diferencias estadísticas en el contenido de sólidos solubles de los granos de cacao fermentados, esto debido al consumo igualitario de azúcares por los microorganismos.

3.1.2 pH

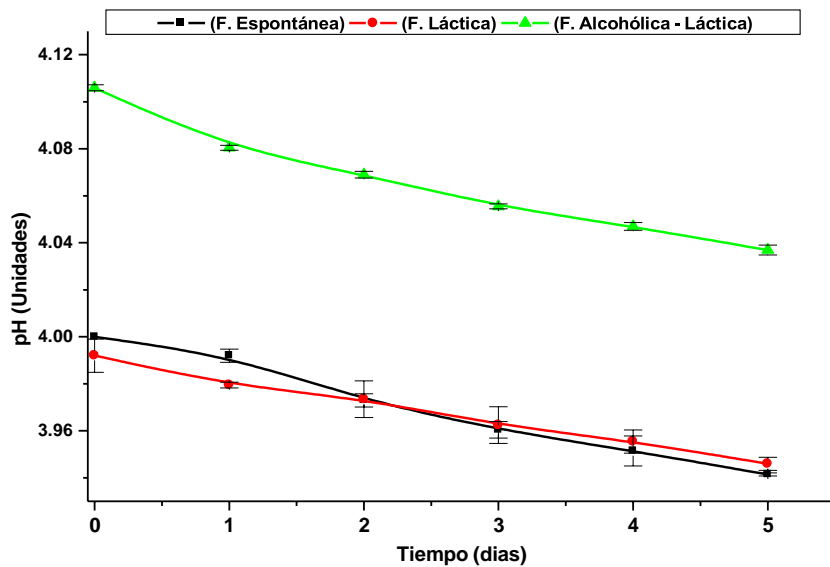


Figura 10. Comportamiento del pH durante la F. espontánea, F. láctica y F. alcohólica-láctica de las almendras de cacao.

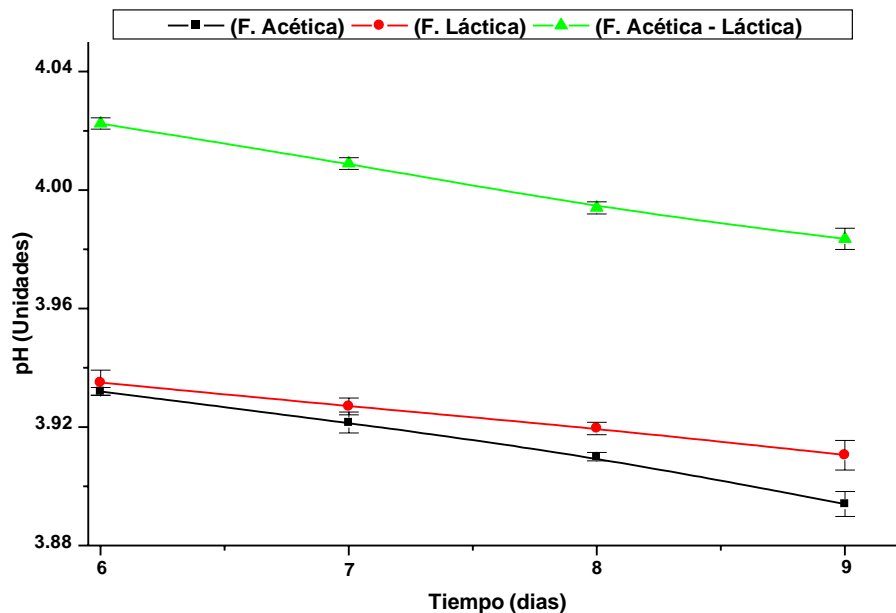


Figura 11. Comportamiento del pH durante la F. acética, F. láctica y F. acética-láctica de las almendras de cacao.

Con respecto a la fermentación espontánea (figura 10) inicia con un pH de 4 hasta llegar a la fermentación acética (figura 11) con un pH de 3,89, se puede observar una disminución del pH. Resultados similares obtuvieron De Vuyst & Weckx, (2016) explica que es debido a, que durante la fermentación espontánea se consume el ácido cítrico para que luego en la fermentación acética se produzca el ácido acético que se infiltra en los cotiledones, haciendo que el pH disminuya.

Al inicio de la fermentación láctica (figura 10 y 11), comienza con pH 3,992 y disminuye lento y minuciosa hasta llegar a 3,91 esto sucede porque, la pulpa del cacao se degrada y el contenido de BAL decrece y el ambiente de la fermentación pasa a fase aerobia (Predan et al., 2019).

Khaway et al., (2014) evidenciaron datos similares, indicando que el pH acompañado de concentraciones de ácido láctico contenidos del suero láctico disminuye el contenido de pH a lo largo de la fermentación.

La fermentación alcohólica - láctica (figura 10) inicia con pH 4,106 hasta llegar a la fermentación acética – láctica (figura 11) con pH 3,98, esto coincide con Horta-Téllez et al., (2019) el cual explica que empieza con el crecimiento de las levaduras, que toman el azúcar de la pulpa de cacao para liberar el etanol. Seguido del desarrollo de bacterias del ácido acético y ácido láctico, lo que produce la disminución del pH.

Tabla 7. Análisis de varianza con respecto al pH

Datos	Media	Varianza	N
F. Espontánea	3,9476	0,0012	10
F. Láctica	3,9501	7,37E-04	10
F. Mixta	4,0404	0,00152	10
F = 24,24099			
<i>p = 9,38699E-7</i>			

El pH con respecto al tiempo según la estadística ($0,000 < 0,05$) existen diferencias significativas, debido al consumo de ácidos presentes en las diferentes fases de fermentación.

Rojas-Rojas et al., (2021) también obtuvieron diferencias significativas del pH correspondiente al tipo de fermentación por la distinción de la fase anaerobia de la aeróbica.

3.1.3 Azúcares reductores

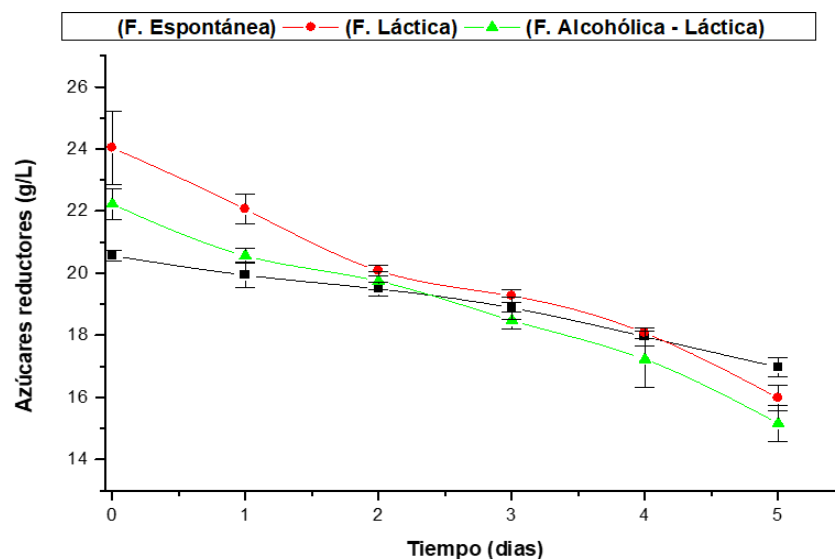


Figura 12. Comportamiento de los azúcares reductores durante la F. espontánea, F. láctica y F. alcohólica - láctica de las almendras de cacao.

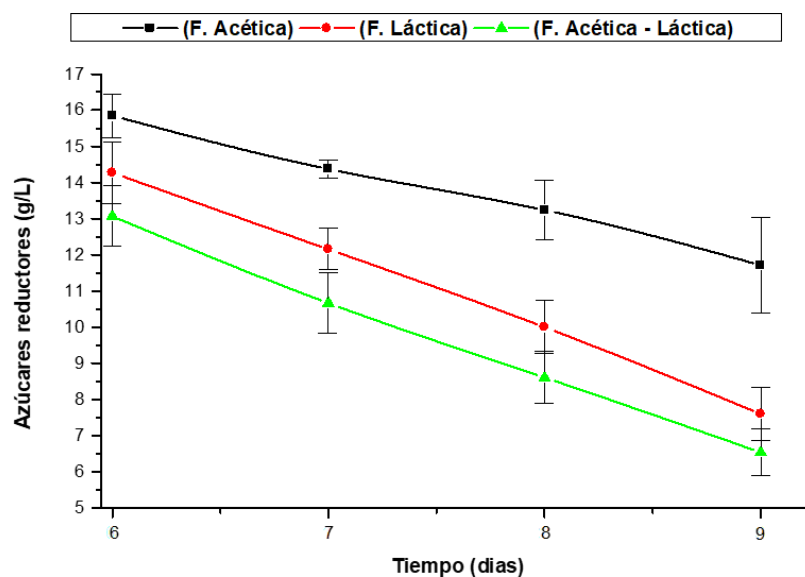


Figura 13. Comportamiento de los azúcares reductores durante la F. acética, F. láctica y F. acética-láctica de las almendras de cacao.

En la fermentación espontánea (figura 12) comienza con 20,56 g/L y disminuye hasta finalizar en la fermentación acética (figura 13) con 11,715 g/L, esto se debe a la emisión de exudado y a la fermentación alcohólica para dar paso a la fermentación acética. González et al., (2021) demuestra un acrecentamiento en la concentración de azúcares reductores, donde explica que

el mucílago de cacao contiene sacarosa, que es hidrolizada en glucosa y fructosa, por la enzima invertasa perteneciente a las levaduras.

Por otro lado, en la fermentación láctica (figura 12 y 13) inicia con 24,03 g/L y finaliza con 7,59 g/L de azúcares reductores, existe una disminución considerable. Puerta Q. & Ríos A., (2014) obtuvieron resultados similares, y opina que, es debido al desgaste de azúcares (glucosa, fructosa) proporcionalmente con la asistencia de BAL presentes en el lactosuero. La fermentación alcohólica – láctica (figura 12) inicia con 22,22 g/L hasta llegar a la fermentación acética - láctica que finaliza con 6,53 g/L (figura 13), es decir, existe una disminución directamente proporcional debido al consumo rápido de los azúcares y debido a una mayor concentración de etanol. Puerta Q. & Ríos A., (2014) coinciden con la disminución y aporta que los azúcares reductores son oxidados por las levaduras y BAL para la producción del etanol, ácido láctico, y otros compuestos.

Tabla 8. Análisis de varianza del contenido de azúcares reductores

Datos	Media	Varianza	N
F. Espontánea	16,896	9,13026	10
F. Láctica	16,3507	28,45391	10
F. Mixta	15,2262	28,57988	10
F = 0,32873			
<i>p = 0,72267</i>			

Los azúcares reductores con respecto al tiempo según la estadística ($0,72 > 0,05$) no existen diferencias significativas, en el contenido de azúcares reductores durante los seis días del proceso de fermentación.

González et al., (2021) presentaron diferencias significativas con respecto al tiempo de fermentación en el contenido de azúcares reductores.

3.1.4 Acidez

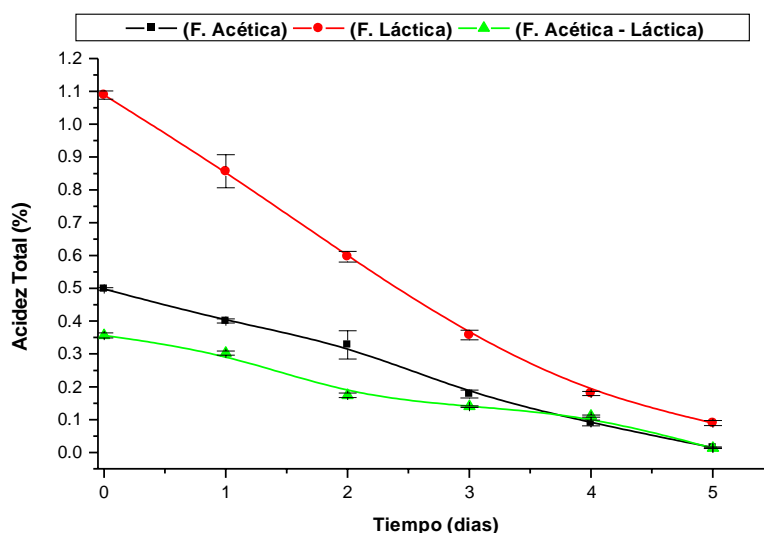


Figura 14. Comportamiento de la acidez durante la F. acética, F. láctica y F. acética-láctica de las almendras de cacao.

En la figura 14, la fermentación acética se determinó una acidez inicial de 0,498 % el cual va disminuyendo lenta, pero considerablemente, hasta llegar a 0,01 % en función del agotamiento del ácido acético durante la fermentación acética. Amorim Homem de Abreu Loureiro et al., (2017) obtuvieron resultados similares, y opina que esto es ocasionado por los ácidos que son degradados en forma de compuestos volátiles, y ocurre la disminución de la acidez.

En la fermentación láctica (figura 14), inicia con 1,089 % y finaliza con 0,089 %, se observa una disminución rápida de la acidez, Sopla & Jara, (2020) obtuvieron datos similares y analiza que ocasiona una baja acidez al disminuir la formación del ácido láctico y acético en la pulpa, también la absorción por el grano durante la fermentación de las almendras del cacao.

En la fermentación acética – láctica (figura 14), se observa una disminución relenteada comenzando con 0.35 % y finaliza con 0,012 %, debido a que existen dos tipos de fermentación, y la oxidación del etanol, los ácidos lácticos y acéticos son lentos.

Tabla 9. Análisis de varianza del contenido de acidez

Datos	Media	Varianza	N
F. Espontánea	0,25131	0,03531	6
F. Láctica	0,52808	0,15403	6
F. Mixta	0,18261	0,01611	6
F = 2,93036			
p = 0,08428			

La acidez con respecto al tiempo según la estadística ($0,084 < 0,05$) no existen diferencias estadísticas en el contenido de acidez total durante los seis días del proceso de fermentación.

Andrade Almeida et al., (2019) adquirieron discrepancias significativas en el contenido de acidez, esto puede ser debido al origen y a la postcosecha del cacao.

3.1.5 Polifenoles totales

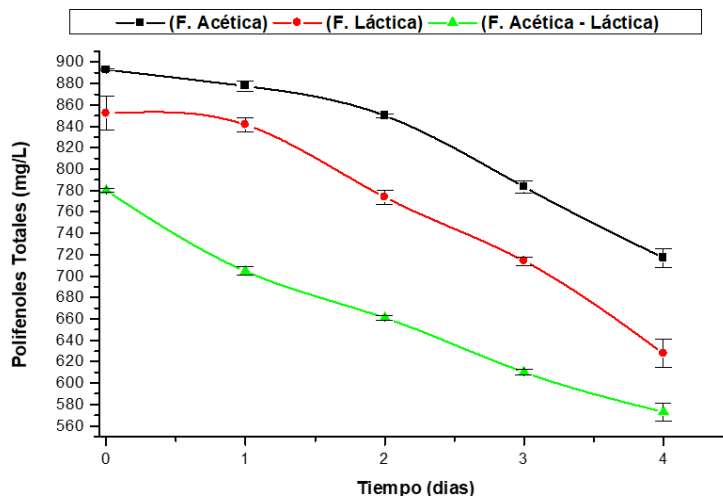


Figura 15. Comportamiento de los Polifenoles Totales durante la F. acética, F. láctica y F. acético-láctica de las almendras de cacao.

En la fermentación acética (figura 15), los polifenoles totales inician con 892,855 mg/L y termina con 717,08 mg/L, es decir disminuyen lentamente, Morales & Lester, (2020) obtuvieron datos similares y explica que ya no existe suficiente oxidación del contenido polifenólico causada por la enzima polifenol oxidasa, esto hace que sean insolubles y puedan reaccionar a las proteínas.

La Fermentación Láctica (figura 15) también disminuyen, e inicia con 852,12 mg/L y finaliza con 627,68 mg/L, Pallares Pallares et al., (2016) obtuvieron datos similares, dando a conocer que es debido a las primeras reacciones enzimáticas y químicas durante los diferentes tipos de fermentación y sustrato utilizado en la fermentación láctica, que convierten los polifenoles en formas más reducidas.

La figura 15, se muestran los resultados de los polifenoles totales con respecto a la fermentación acético-láctica, tiende a reducirse considerablemente, pues inicia con 780,04 mg/L y finaliza con 573,07 mg/L, estos resultados son similares con Servent et al., (2018) puede ser explicado por presencia de la enzima polifenol oxidasa, da como resultado disminución de amargor y de

las almendras de cacao, haciendo que ocurra la migración de polifenoles fuera del grano para su posterior oxidación.

Tabla 10. Análisis de varianza del contenido fenoles totales durante la fermentación

Datos	Media	Varianza	N
F. Espontánea	824,183	5344,12523	5
F. Láctica	761,87	8733,82604	5
F. Mixta	665,764	6566,91007	5
F = 4,62777			
<i>p</i> = 0,03238			

De acuerdo con el análisis de varianza ($0,03 < 0,05$), si existe diferencias significativas, debido a las reacciones enzimáticas que ocasionan la degradación de polifenoles, así mismo, como el rendimiento de cada tipo de fermentación.

Horta-Téllez et al., (2019) también mostraron diferencias significativas con respecto al tipo de fermentación, debido a la composición del sustrato utilizado en cada tipo de fermentación.

Tabla 11. Análisis de varianza del contenido fenoles totales después del secado y tostado

Datos	Media	Varianza	N
Sin Fermentar	660,285	7,88045	2
F. Espontánea	650,57	2,1218	2
F. Láctica	507,055	25,56125	2
F. Mixta	484,145	23,05205	2
F = 1176.22733			
<i>p</i> = 2.40297E-6			

De acuerdo con el análisis de varianza ($0,00 < 0,05$), existe diferencias significativas sobre el contenido de polifenoles totales después del secado y tostado, debido a la exposición de altas temperaturas en el secado y tostado, también se debe a la composición de los diferentes sustratos adicionados en cada tipo de fermentación.

El contenido de polifenoles totales después del tostado de las almendras de cacao Sin fermentación fue 660,28 mg/L, para la fermentación espontánea 650,57 mg/L, en la fermentación láctica 507,06 mg/L, y, por último, en la fermentación alcohólica – láctica fue de 484,14 mg/L, como se puede observar este último tipo de fermentación logro disminuir los polifenoles totales, reduciendo así el contenido de amargor en las almendras de cacao.

Calderón et al., (2016) obtuvieron datos similares y aporta que los polifenoles totales durante el tostado reaccionan con las proteínas, lo que hace que ocurra una disminución de los mismos. De igual modo, en otras investigaciones, evidencian que el proceso de tostado posee mayor influencia que más afecta a los niveles de tostado de las semillas de cacao.

3.1.6 Ácido láctico

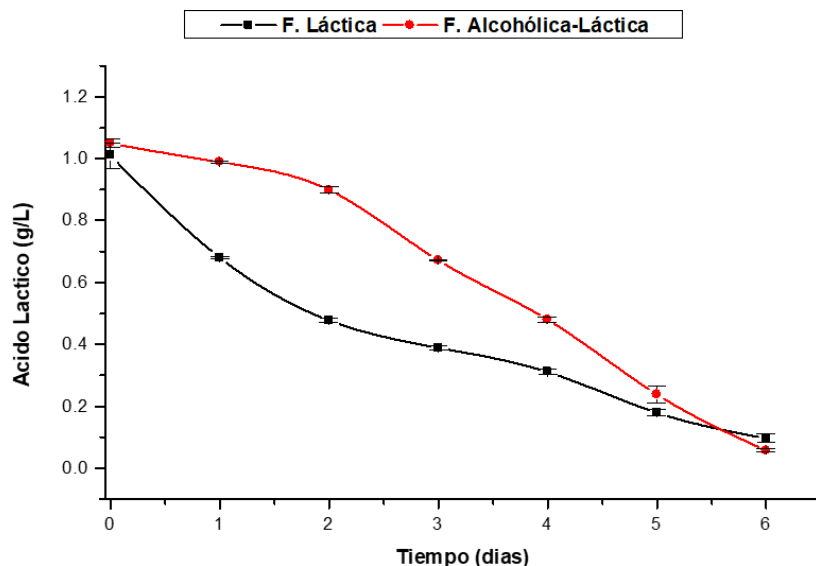


Figura 16. Comportamiento del Ácido Láctico durante la F. acética, F. láctica y F. acética-láctica de las almendras de cacao.

En la figura 16, la fermentación láctica inicia con 1,01 g/L y finaliza con 0,09 g/L, se puede observar un descenso rápido del ácido láctico, esto debido a que, en esta fase el accionar de las BAL transforman los azúcares y algunos ácidos orgánicos en ácido láctico. Rojas-Rojas et al., (2021) obtuvieron datos similares, y opina que es debido al consumo de los componentes presentes en la pulpa para la mejora de los precursores de aroma y sabor dentro de las almendras de cacao.

En la fermentación acética – láctica (figura 16) inicia con 1,05 g/L y termina con 0,057 g/L, donde se observa que el descenso es lento, debido a que existen dos componentes (ácido acético y ácido láctico) y son transformadas en lactato de etilo en la fermentación acética. Serra et al., (2019) mostraron datos similares y aporta que la disminución del ácido láctico es debido al lactato para una mejor calidad sensorial de las almendras de cacao. Caso contrario, si encuentran en niveles elevados disminuye la calidad sensorial.

Tabla 12. Análisis de varianza del contenido de ácido láctico durante la fermentación

Datos	Media	Varianza	N
F. Láctica	0,48295	0,1009	7
F. Mixta	0,62608	0,14726	7
F = 0,57788			
$p = 0,46182$			

Como podemos apreciar en la tabla 12, no existe diferencia significativa en la producción de ácido láctico durante los seis días del proceso de fermentación.

3.1.7 Análisis sensorial

En la figura 17, muestran en un gráfico de barras los resultados de la evaluación sensorial de los atributos analizados de los tipos de fermentación, en una escala de 0 a 5 que estuvieron presentes en el chocolate; con respecto al chocolate sin fermentación presentan puntuación de: dulce 0,3, destacando su alto amargor con una puntuación de 4,3, seguido del astringente de 3,5, aroma de 2,9 y acidez de 2,6. Con respecto a la fermentación espontánea el dulce posee una puntuación de 0,4, amargor de 3,1, astringente 3,6, acidez 2,8 y aroma de 2,7. En la fermentación láctea el dulce puntúa 0,4, amargor de 3,1, astringente 3,6, acidez 2,8 y aroma de 2,7. En la fermentación alcohólica – láctea, astringente 3,2, aroma 3,1, acidez de 2,6, dulce 0,4 y amargor de 3.

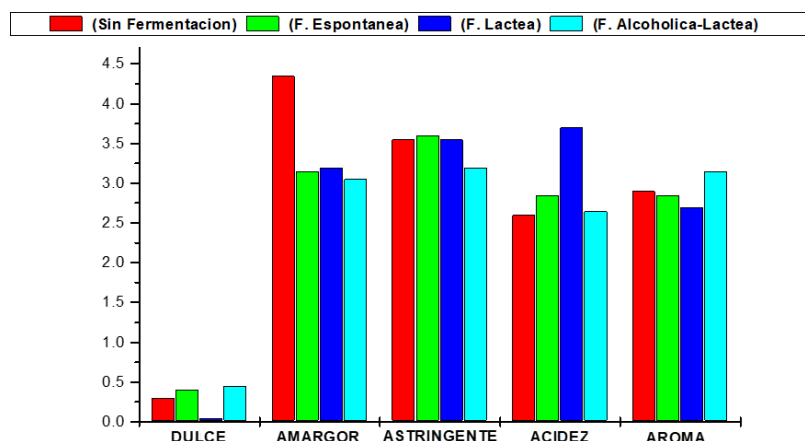


Figura 17. Análisis sensorial

Tabla 13. Análisis de varianza del análisis sensorial

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
TIPO DE FERMENTACION	3	22,44	7,479	7,00	0,000
Error	76	81,25	1,069		
Total	79	103,69			

En el análisis sensorial según la estadística ($0,00 < 0,05$) existe diferencias significativas, es decir, que existe diferencias significativas entre los diferentes tipos de fermentación con respecto a los atributos evaluados.

Tabla 14. Prueba de Tukey con respecto a los tipos de fermentación

TIPO DE FERMENTACIÓN	N	Media	Agrupación
Sin Fermentar	20	4,350	A
F. Espontánea	20	3,200	B
F. Láctica	20	3,150	B
F. Mixta	20	3,050	B

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

Se realizó una prueba de Tukey para observar cuales son iguales o significativamente diferentes, dando como resultado que las almendras de cacao sin fermentar no son significativamente igual, a comparación de las otras fermentaciones aplicadas son significativamente iguales, sin embargo, la fermentación alcohólica-láctica es la que posee una media menor a comparación de las otras, en otras palabras; este tipo de fermentación es la adecuada para reducir el amargor en las almendras de cacao.

CONCLUSIONES

- Los resultados obtenidos de los análisis físico – químicos (pH, sólidos solubles, acidez, azúcares reductores, polifenoles totales, ácido láctico) de las almendras de cacao fino de aroma, permitieron la observación el comportamiento de cada uno de los tipos de fermentación en función del tiempo, el cual dependiendo el tipo de fermentación estos aumentan o disminuyen.
- Con respecto al contenido de polifenoles totales, se demostró que durante el proceso de fermentación disminuyen, sabiendo que el objetivo principal es reducir el amargor de las almendras de cacao. Dando como resultado, que la fermentación alcohólica – láctica es el mejor tipo de fermentación para la reducción del amargor en las almendras de cacao fino de aroma. Tras el secado y tostado, el resultado de los polifenoles totales fueron 484,14 mg/L, el que menos contenido polifenólico obtuvo después de las etapas mencionadas.
- Respecto al análisis sensorial con una escala de 0 a 5, dio como resultado que en la fermentación alcohólica – láctica se percibe menos a amargor con una puntuación de 3, a comparación de las otras fermentaciones aplicadas a las almendras de cacao fino de aroma.

RECOMENDACIONES

- Utilizar materia prima en su índice de madurez indicado; caso contrario, no se desarrollará todos los atributos, que posee el cacao para su posterior procesamiento a chocolate.
- Controlar las fermentaciones adecuadamente para que las almendras de cacao tengan la mejor calidad posible, tomando en cuenta que ocurren diversas reacciones y cambios físico-químicos.
- Evitar que las almendras se expongan a temperaturas muy elevadas durante el proceso de tostado, pues esto provocara que se desarrollen aromas y sabores muy fuertes, que no son característicos del cacao.

BIBLIOGRAFIA

- Acevedo, D., Guzmán, L., & Rodríguez, A. (2013). *Cinética de la fermentación en la producción de suero costeño*. <https://revistas.udca.edu.co/index.php/ruadc/article/view/915>
- Afoakwa, E. O. (2016). History, origin and taxonomy of cocoa. *Chocolate Science and Technology*, 1–16. <https://doi.org/10.1002/9781118913758.CH1>
- Aguilar, J., Espinoza, M., Cabanillas, J., Ávila, I., García, A., Julca, J., Tacanga, D., Zuta, I., & Linares, G. (2015). Evaluación de la cinética de crecimiento de *saccharomyces cerevisiae* utilizando un medio de cultivo a base de melaza de caña y suero lácteo. *Agroindustrial Science*, 5(1), 37–47.
- Alean, J., Chejne, F., & Rojano, B. (2016). Degradation of polyphenols during the cocoa drying process. *Journal of Food Engineering*, 189, 99–105.
- Alvites Quispe, A. (2022). *Uso de cuajos naturales para la producción de queso artesanal - Huironay - Pacobamba - Andahuaylas 2019* [Universidad Tecnológica de los Andes]. <https://repositorio.utea.edu.pe/handle/utea/475>
- Amorim Homem de Abreu Loureiro, G., Reis de Araujo, Q., René-Valle, R., Andrade-Sodré, G., & Moreira de Souza, S. M. (2017). Influencia de factores agroambientales sobre la calidad del clon de cacao (*Theobroma cacao* L.) PH-16 en la región cacaotera de Bahia, Brasil. *Ecosistemas Y Recursos Agropecuarios*, 4(12), 579.
- Andrade Almeida, J., Rivera García, J., Chire Fajardo, G. C., & Ureña Peralta, M. O. (2019). Propiedades físicas y químicas de cultivares de cacao *Theobroma cacao* L. de Ecuador y Perú. *Enfoque UTE*, 10(4), 1–12.
- Aprotosoiaie, A. C., Luca, S. V., & Miron, A. (2016). Flavor Chemistry of Cocoa and Cocoa Products-An Overview. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 15(1), 73–91. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12180>
- Ayala-Zavala, J. F., Silva-Espinoza, B. A., Cruz-Valenzuela, M. R., Villegas-Ochoa, M. A., Esqueda, M., González-Aguilar, G. A., & Calderón-López, Y. (2012). Antioxidant and antifungal potential of methanol extracts of *Phellinus* spp. from Sonora, Mexico. *Revista Iberoamericana de Micología*, 29(3). <https://doi.org/10.1016/j.riam.2011.09.004>
- Barrientos, L. D. P., Oquendo, J. D. T., Garzón, M. A. G., & Álvarez, O. L. M. (2019). Effect of the solar drying process on the sensory and chemical quality of cocoa (*Theobroma cacao* L.) cultivated in Antioquia, Colombia. *Food Research International*, 115, 259–267.
- Bohorquez, C., & Paulina, R. (2019). *Automatización de un sistema de fermentación de almendras de cacao (theobroma cacao l.) para pequeños productores de El Oro*. <http://repositorio.utmachala.edu.ec/handle/48000/13832>
- Caligiani, A., Marseglia, A., Prandi, B., Palla, G., & Sforza, S. (2016). Influence of fermentation level and geographical origin on cocoa bean oligopeptide pattern. *Food Chemistry*, 211. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.05.072>

- Caligiani, A., Marseglia, A., Prandi, B., Palla, G., & Sforza, S. (2016). Influence of fermentation level and geographical origin on cocoa bean oligopeptide pattern. *Food Chemistry*, 211. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.05.072>
- Carrillo, L. C., Londoño-Londoño, J., & Gil, A. (2014). Comparison of polyphenol, methylxanthines and antioxidant activity in Theobroma cacao beans from different cocoa-growing areas in Colombia. *Food Research International*, 60, 273–280. <https://doi.org/10.1016/J.FOODRES.2013.06.019>
- Castro-Alayo, E. M., Idrogo-Vásquez, G., Siche, R., & Cardenas-Toro, F. P. (2019). Formation of aromatic compounds precursors during fermentation of Criollo and Forastero cocoa. *Heliyon*, 5(1). <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2019.e01157>
- Cevallos-Cevallos, J. M., Gysel, L., Maridueña-Zavala, M. G., & Molina-Miranda, M. J. (2018). Time-Related Changes in Volatile Compounds during Fermentation of Bulk and Fine-Flavor Cocoa (*Theobroma cacao*) Beans. *Journal of Food Quality*, 2018. <https://doi.org/10.1155/2018/1758381>
- Crafack, M., Keul, H., Eskildsen, C. E. A., Petersen, M. A., Saerens, S., Blennow, A., Skovmand-Larsen, M., Swiegers, J. H., Petersen, G. B., Heimdal, H., & Nielsen, D. S. (2014). Impact of starter cultures and fermentation techniques on the volatile aroma and sensory profile of chocolate. *Food Research International*, 63, 306–316. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2014.04.032>
- Crafack, M., Mikkelsen, M. B., Saerens, S., Knudsen, M., Blennow, A., Lowor, S., Takrama, J., Swiegers, J. H., Petersen, G. B., Heimdal, H., & Nielsen, D. S. (2013). Influencing cocoa flavour using *Pichia kluyveri* and *Kluyveromyces marxianus* in a defined mixed starter culture for cocoa fermentation. *International Journal of Food Microbiology*, 167(1), 103–116.
- Cuenca-Cuenca, E. W., Puentes-Páramo, Y. J., & Menjivar-Flores, J. C. (2019). Efficient use of nutrients in fine aroma cacao in the province of Los Ríos-Ecuador. *Revista Facultad Nacional de Agronomía Medellín*, 72(3), 8963–8970.
- De Vuyst, L., & Leroy, F. (2020). Functional role of yeasts, lactic acid bacteria and acetic acid bacteria in cocoa fermentation processes. *FEMS Microbiology Reviews*, 44(4), 432–453.
- De Vuyst, L., & Weckx, S. (2016). The cocoa bean fermentation process: from ecosystem analysis to starter culture development. *Journal of Applied Microbiology*, 121(1). <https://doi.org/10.1111/jam.13045>
- Deus, V. L., Cerqueira E Silva, M. B. de, Maciel, L. F., Miranda, L. C. R., Hirooka, E. Y., Soares, S. E., Ferreira, E. de S., & Bispo, E. da S. (2018). Influence of drying methods on cocoa (*Theobroma cacao* L.): antioxidant activity and presence of ochratoxin A. *Food Science and Technology*, 38(suppl 1), 278–285.
- Estremadoyro, L. G., Sánchez, N. M., & Munive, C. M. (2015). Evaluación de parámetros físicos, químicos y microbiológicos del queso fresco prensado producido en la región Junín, Perú. *Apuntes de Ciencia & Sociedad*, 5(2), 1–1.

- Giacometti, J., Jolić, S. M., & Josić, D. (2015). Cocoa Processing and Impact on Composition. In *Processing and Impact on Active Components in Food* (pp. 605–612). Elsevier.
- Gonzalez, E. G., Muñoz, A. F. O., Rodríguez, C. M., Narvaéz, G. A. O., & Hernández, L. L. (2021). Sucesión microbiana durante la fermentación espontánea de cacao en unidades productivas. *Ciencia en Desarrollo*, 12(2). <https://doi.org/10.19053/01217488.v12.n2.2021.12242>
- Gutierrez, E. A., Caetano, A. C., Hoyos, Y. R., Santos, M. G., & Espinoza, S. L. (2022). Physicochemical and organoleptic profile of the native fine aroma cocoa from northeastern area of Peru. *Food Science and Technology*, 42, e06422.
- Gutiérrez, T. J. (2017). State-of-the-Art Chocolate Manufacture: A Review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 16(6), 1313–1344.
- Gutiérrez-Ríos, H. G., Suárez-Quiroz, M. L., Hernández-Estrada, Z. J., Castellanos-Onorio, O. P., Alonso-Villegas, R., Rayas-Duarte, P., Cano-Sarmiento, C., Figueroa-Hernández, C. Y., & González-Rios, O. (2022). Yeasts as producers of flavor precursors during cocoa bean fermentation and their relevance as starter cultures: A review. *Fermentation*, 8(7), 331.
- Hamdouche, Y., Meile, J. C., Lebrun, M., Guehi, T., Boulanger, R., Teyssier, C., & Montet, D. (2019). Impact of turning, pod storage and fermentation time on microbial ecology and volatile composition of cocoa beans. *Food Research International*, 119, 477–491.
- Hartel, R. W., von Elbe, J. H., & Hofberger, R. (2017). *Confectionery Science and Technology*. Springer International Publishing.
- Hernández, L., & del Pilar, M. (2018). *Efecto del estado de madurez de materiales de cacao sobre la calidad final del grano en los valles interandinos secos* [Universidad Nacional de Colombia]. <https://repositorio.unal.edu.co/handle/unal/63142>
- Hernández-Hernández, C., López-Andrade, P. A., Ramírez-Guillermo, M. A., Guerra Ramírez, D., & Caballero Pérez, J. F. (2016). Evaluation of different fermentation processes for use by small cocoa growers in Mexico. *Food Science & Nutrition*, 4(5), 690–695.
- Ho, V. T. T., Fleet, G., & Zhao, J. (2018). Unravelling the contribution of lactic acid bacteria and acetic acid bacteria to cocoa fermentation using inoculated organisms. *International Journal of Food Microbiology*, 279: 43-56.
- Ho, V. T. T., Zhao, J., & Fleet, G. (2014). Yeasts are essential for cocoa bean fermentation. *International Journal of Food Microbiology*, 174, 72–87.
- Horta-Téllez, H. B., Sandoval-Aldana, A. P., Garcia-Muñoz, M. C., & Cerón-Salazar, I. X. (2019). Evaluation of the fermentation process and final quality of five cacao clones from the department of Huila, Colombia. *DYNA*, 86(210), 233–239.
- Intriago, F. M., Zenteno, M. C., Neto, J. F., Galeas, M. P., Caicedo, W. B., & Moyano, M. A. (2018). Cadena de comercialización del cacao nacional en la provincia de Los Ríos, Ecuador. *Ciencia y Tecnología*, 11(1), 63–69.

- Kongor, J. E., Hinneh, M., Van de Walle, D., Afoakwa, E. O., Boeckx, P., & Dewettinck, K. (2016). Factors influencing quality variation in cocoa (*Theobroma cacao*) bean flavour profile — A review. *Food Research International*, 82, 44–52.
- Lau, R., & Jimena, M. C. (2020). *Evaluación paramétrica en tostado de cacao piurano con diseño factorial 3k, y determinación del perfil sensorial* [Universidad de Piura]. <https://hdl.handle.net/11042/4459>
- Lieberei, R., Kadow, D., & Seigler, D. (2013). Cocoa cultivation, directed breeding and polyphenolics. In *Natural Products* (pp. 1599–1616). Springer Berlin Heidelberg.
- Loja Atariguana, R. V., & Montesdeoca Loja, V. J. (2022). *Determinación del efecto en diferentes niveles de fermentación del cacao nacional, para la optimización del proceso de elaboración del chocolate*. <http://repositorio.utmachala.edu.ec/handle/48000/19674>
- López Medina, S. E., & Gil Rivero, A. E. (2017). Características germinativas de semillas de *Theobroma cacao* L. (Malvaceae) “cacao.” *Arnaldoa*, 24(2), 609–618.
- López, A. D., Plaza-Avellán, L. F., Rivadeneira-Moreira, B. J., Párraga-Palacios, F. M., & Herrera-Suárez, M. (2020). Comparación de tres variantes de preparación del sustrato empleado en la propagación de patrones de cacao. *Revista Ciencias Técnicas Agropecuarias*, 29(3), 37–49.
- Ludisaca, A. (2017). *Diseño de un proceso industrial para la elaboración de cerveza artesanal a base de cebada (Hordeum Vulgare) y cacao de fino aroma (Theobroma Cacao)* [Escuela Superior Politécnica de Chimborazo]. <http://dspace.esPOCH.edu.ec/handle/123456789/6593>
- Mazorra-Manzano, M. Á., & Moreno-Hernández, J. M. (2019). Propiedades y opciones para valorizar el lactosuero de la quesería artesanal. *CienciaUAT*, 14(1), 133–144.
- Moens, F., Lefeber, T., & De Vuyst, L. (2014). Oxidation of Metabolites Highlights the Microbial Interactions and Role of *Acetobacter pasteurianus* during Cocoa Bean Fermentation. *Applied and Environmental Microbiology*, 80(6), 1848.
- Montañez, L. J. B. (2020). Cuantificación de azúcares reductores del sustrato en residuos de piña con el método del ácido 3,5-dinitrosalicílico. *Revista de investigación*, 13(1), 57–66.
- Morales, C., & Lester, I. (2020). *Fermentación asistida de cacao (Theobroma cacao) y participación de Zamorano en la investigación e innovación de derivados de este cultivo: Revisión literaria* [Zamorano: Escuela Agrícola Panamericana, 2020]. <https://bdigital.zamorano.edu/handle/11036/6909>
- Norberto, A. P., Marmentini, R. P., Carvalho, P. H., Campagnollo, F. B., Takeda, H. H., Alberte, T. M., Rocha, R. S., Cruz, A. G., Alvarenga, V. O., & Sant’Ana, A. S. (2018). Impact of partial and total replacement of milk by water-soluble soybean extract on fermentation and growth parameters of kefir microorganisms. *Lebensmittel-Wissenschaft + [i.e. Und] Technologie. Food Science + Technology. Science + Technologie Alimentaire*, 93, 491–498.

- Núñez, J. M., Bahamón-Monje, A. F., & García-Rincón, P. A. (2021). Características físico-químicas y sensoriales de almendras fermentadas de cacao nacional (*Theobroma Cacao L.*) con adición de probióticos en el centro de investigaciones amazónicas, Cimaz Macagual (Caquetá, Colombia). *INGENIERÍA Y COMPETITIVIDAD*, 23(2), e21210885. <https://doi.org/10.25100/iyc.v23i2.10885>
- Oracz, J., & Nebesny, E. (2019). Effect of roasting parameters on the physicochemical characteristics of high-molecular-weight Maillard reaction products isolated from cocoa beans of different *Theobroma cacao L.* groups. *European Food Research and Technology = Zeitschrift Fur Lebensmittel-Untersuchung Und -Forschung. A*, 245(1), 111–128.
- Ortega, T., & Elías, G. (2015). *Estudio de las propiedades físico-químicas y sensoriales del chocolate a partir del cacao fino de aroma con diferentes tiempos de fermentación* [CIENCIAS DE LA INGENIERÍA E INDUSTRIAS FACULTAD: INGENIERÍA DE ALIMENTOS]. <http://repositorio.ute.edu.ec/handle/123456789/14279>
- Pallares Pallares, A., Estupiñán A, M. R., Perea Villamil, J. A., & López Giraldo, L. J. (2016). Impacto de la fermentación y secado sobre el contenido de polifenoles y capacidad antioxidante del clon de cacao CCN-51. *Revista ION*, 29(2), 7–21.
- Papalexandratou, Z., Lefeber, T., Bahrim, B., Lee, O. S., Daniel, H. M., & De Vuyst, L. (2013). *Hanseniaspora opuntiae*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Lactobacillus fermentum*, and *Acetobacter pasteurianus* predominate during well-performed Malaysian cocoa bean box fermentations, underlining the importance of these microbial species for a successful cocoa bean fermentation process. *Food Microbiology*, 35(2). <https://doi.org/10.1016/j.fm.2013.02.015>
- Penagos Muñeton, A. (2019). *Estandarización del proceso de fermentación de cacao (Theobroma cacao L.) en función de la relación entre la masa de grano y el volumen del cajón fermentador*. <https://repositorio.unal.edu.co/handle/unal/76069>
- Predan, G. M. I., Lazăr, D. A., & Lungu, I. I. (2019). Cocoa industry—from plant cultivation to cocoa drinks production. In *Caffeinated and Cocoa Based Beverages* (pp. 489–507). Elsevier.
- Puerta Q., G. I., & Rios A., S. (2014). *Composición química del mucílago de café según el tiempo de fermentación y refrigeración*. <http://hdl.handle.net/10778/478>
- Ramos, C., & Gretel, M. (2019). *Determinación de parámetros para la obtención y conservación de cuajo bovino en el distrito de Cajamarca* [Universidad Nacional de Cajamarca]. <http://hdl.handle.net/20.500.14074/3056>
- Rincón Santamaría, A., Cuellar Gil, J. A., Valencia Gil, L. F., & Sánchez Toro, O. J. (2019). CINÉTICA DE CRECIMIENTO DE *GLUCONACETOBACTER DIAZOTROPHICUS* USANDO MELAZA DE CAÑA Y SACAROSA: EVALUACIÓN DE MODELOS CINÉTICOS. *Acta Biológica Colombiana*, 24(1), 38–57.
- Robalino, J. (2017). *Obtención de ácido láctico a partir de suero de leche mediante un proceso biofermentativo utilizando un cultivo mesófilo homofermentativo*. <http://bibdigital.epn.edu.ec/handle/15000/17484>

- Rojas S, M., Chejne, F., Ciro, H., & Montoya, J. (2020). Roasting impact on the chemical and physical structure of Criollo cocoa variety (*Theobroma cacao* L). *Journal of Food Process Engineering*, 43(6). <https://doi.org/10.1111/jfpe.13400>
- Rojas-Rojas, K., Hernández-Aguirre, C., & Mencía-Guevara, A. (2021). Transformaciones bioquímicas del cacao (*Theobroma cacao* L.) durante un proceso de fermentación controlada. *Agronomía Costarricense*, 45(1), 53–65.
- Romero, C. A., & Urrego, V. E. (2016). Estudio del Cacao en el Perú y el Mundo. Un Análisis de la producción y el comercio (pp. 1-90). Lima: Ministerio de Agricultura y Riego.
- Servent, A., Boulanger, R., Davrieux, F., Pinot, M. N., Tardan, E., Forestier-Chiron, N., & Hue, C. (2018). Assessment of cocoa (*Theobroma cacao* L.) butter content and composition throughout fermentations. *Food Research International*, 107, 675–682. <https://doi.org/10.1016/J.FOODRES.2018.02.070>
- Torres, M. G., & Gómez, S. L. (2019). ÁCIDO LÁCTICO: UNA REVISIÓN SOBRE LOS MÉTODOS DE DETERMINACIÓN Y PURIFICACIÓN. *Biociencias*, 14(2), 111–141.
- Unda, S. B., & Carrillo, J. E. C. (2017). Características sociales y económicas de la producción de cacao en la provincia El Oro, Ecuador. *La Técnica*, 2, 25–34.
- Vázquez-Ovando, A., Ovando-Medina, I., Adriano-Anaya, L., Betancur-Ancona, D., & Salvador-Figueroa, M. (2016). Cacao alkaloids and polyphenols: Mechanisms that regulate their biosynthesis and its implications on the taste and aroma. *Archivos Latinoamericanos de Nutricion*, 66(3), 239–254.
- Velásquez, D. E. M., Berrezueta, M. M. Z., Muñoz, S. A. S., Arévalo, M. L. C., & Uribe, L. S. R. (2020). Modificación bioquímica de las almendras de cacao en la etapa de postcosecha con la adición de levadura (*saccharomyces cerevisiae*) y melaza, para mejorar su calidad. *Ingeniería e Innovación*, 8(1). <https://revistas.unicordoba.edu.co/index.php/rri/article/view/2313>
- Visintin, S., Alessandria, V., Valente, A., Dolci, P., & Cocolin, L. S. (2016). Molecular identification and physiological characterization of yeasts, lactic acid bacteria and acetic acid bacteria isolated from heap and box cocoa bean fermentations in West Africa. *International Journal of Food Microbiology*, 216, 69–78.
- Vivar, M., & Arturo, F. (2016). *Fertilización del cultivo de cacao (Theobroma cacao L.)*. <http://repositorio.iniap.gob.ec/handle/41000/3524>
- Zapata, K., Cortes, F. B., & Rojano, B. A. (2013). Polifenoles y Actividad Antioxidante del Fruto de Guayaba Agria (*Psidium araca*). *Información Tecnológica*, 24(5), 103–112.

ANEXOS

Anexo 1. Recolección de mazorcas de cacao



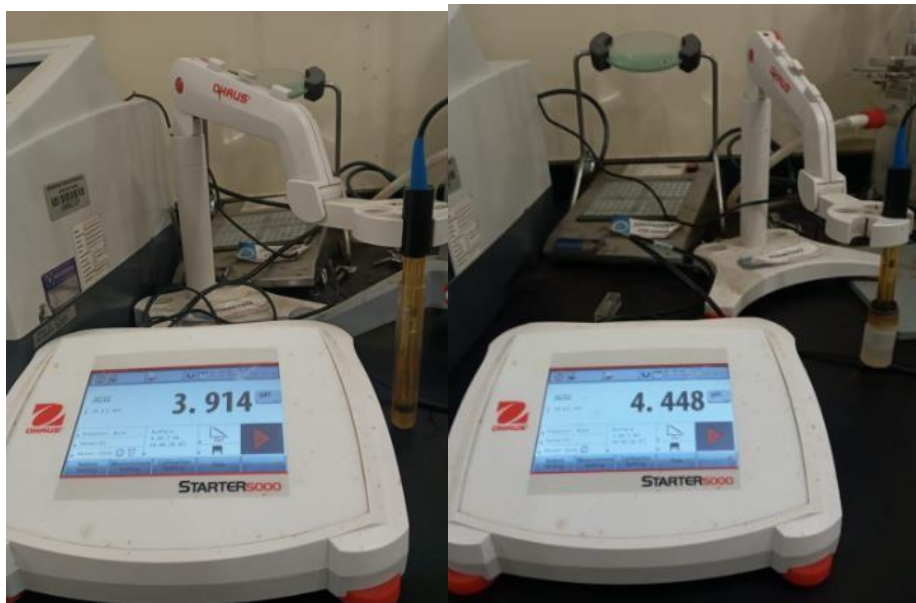
Anexo 2. Desvenado de semillas de cacao



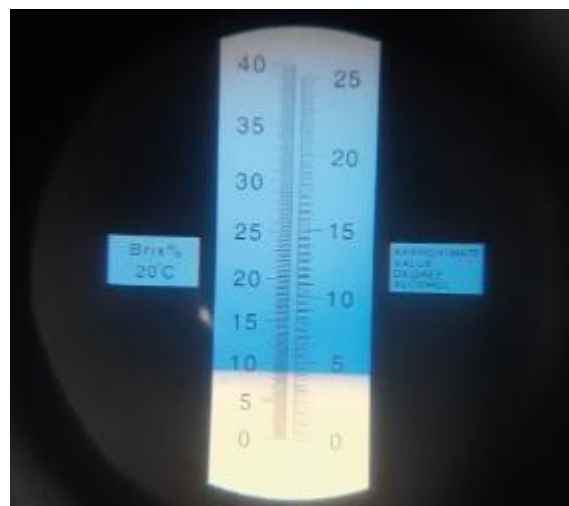
Anexo 3. Fermentación de las almendras de cacao



Anexo 4. Análisis fisicoquímico (ph)



Anexo 5. Análisis fisicoquímico (solidos solubles)



Anexo 6. Análisis fisicoquímico (azúcares reductores)



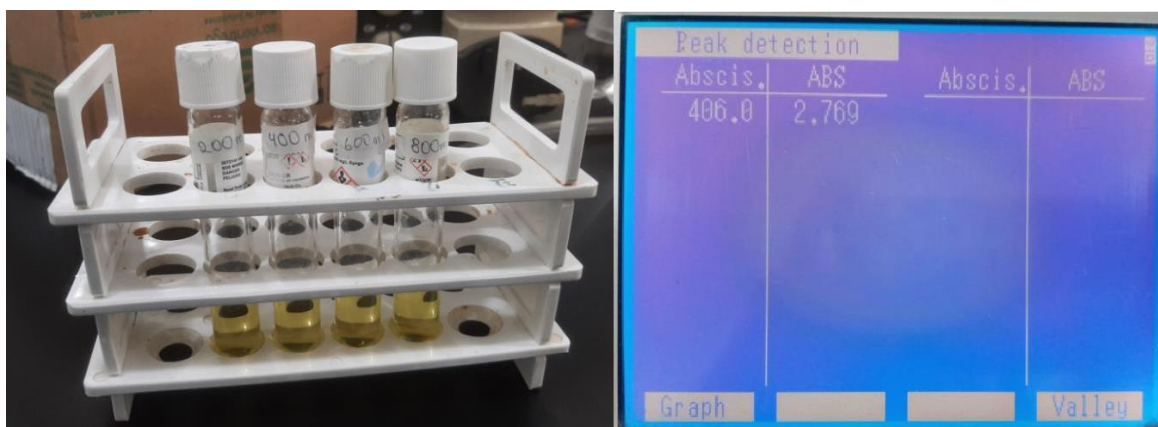
Anexo 7. Análisis fisicoquímico (acidez)



Anexo 8. Análisis fisicoquímico (polifenoles totales)



Anexo 9. Análisis fisicoquímico (ácido láctico)



Anexo 10. Secado de las almendras de cacao



Anexo 11. Tostado de las almendras de cacao



Anexo 12. Molienda de las almendras de cacao





Anexo 13. Análisis sensorial a docentes de la Universidad Técnica de Machala



