



**ESCUELA UNIVERSITARIA DE POSGRADO**

**“EFECTO DE LA ENZIMA PECTOLÍTICA Y LEVADURA (*Saccharomyces cerevisiae*) EN LA FERMENTACIÓN Y CALIDAD DEL CACAO VAR. CRIOLLO (*Theobroma cacao*)”**

**MODALIDAD PARA OPTAR EL GRADO:  
DOCTOR EN CIENCIAS DE LOS ALIMENTOS**

**AUTOR:**

**OTÁROLA GAMARRA ANTONIO**

**ASESOR:**

**DR. SANDOVAL RICCI ALDO JUAN**

**JURADO:**

**DR. BOLIVAR JIMÉNEZ JOSÉ LUIS**

**DR. CABRERA CARRANZA CARLOS FRANCISCO**

**DR. ZAVALA SOLORZANO MAX JOHN**

**LIMA - PERÚ**

**2018**

## **DEDICATORIA**

*Esta tesis lo dedico a mi familia, que siempre me están alentando y motivando, para el logro de mis metas trazadas*

## **AGRADECIMIENTO**

En especial al señor Jesucristo que es mi soporte espiritual y guía de mis acciones diarias, por bendecirme con sabiduría y prudencia, en mi vida diaria.

A mis hermanos Esther, José, Víctor y Luz, por su aliento constante para culminar esta etapa de formación profesional.

A amigos del doctorado en Ciencia de los Alimentos, con quienes compartí y adquirí nuevos conocimientos y experiencias,

A mi asesor doctor Aldo Juan Sandoval Ricci, por la motivación y apoyo en la tesis.

Al Licenciado Virgilio Lino García Veli, Catador experto de cacao y equipo de catadores de la Empresa COFFEE CAULITY INSTITUTE y APPCACAO.

A La Cooperativa Agraria Cafetalera y Cacaotera Pangoa, por las facilidades prestadas

Al Laboratorio de Control de Calidad de Alimentos de la UNCP y Laboratorio de Investigación de Productos Naturales de la UPCH.

A la Universidad Nacional Daniel Alcides Carrión, Escuela Profesional de Ingeniería en Industrias Alimentarias, por ser parte de ella, y por brindarme el apoyo con el laboratorio de Análisis de Alimentos para el desarrollo de esta investigación.

A todas las personas que de una o u otra manera, colaboraron o participaron en la realización de esta investigación.

## INDICE GENERAL

	Página
RESUMEN	14
ABSTRACT	15
INTRODUCCION	16
CAPITULO I: PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	19
1.1. ANTECEDENTES	19
1.2. Planteamiento del problema	25
1.3. Objetivos	27
1.4. Justificación e importancia	28
1.5. Alcances y limitaciones	31
CAPITULO II: MARCO TEORICO	32
2.1. CACAO	32
2.1.1. Grupos germoplásmicos	33
2.1.2. Composición fisicoquímica del cacao	35
2.1.3. Producción de cacao en el Perú	37
2.2. POST COSECHA DEL CACAO	40
2.3. FERMENTACION DEL CACAO	41
2.3.1. Etapas de la fermentación	44
2.3.2. Características tecnológicas de fermentación de cacao	50
2.3.3. Influencia de los parámetros de fermentación en las características sensoriales del cacao	53
2.3.4. Influencia de los parámetros de fermentación en las características físico-químicas del cacao	55

2.3.5. Influencia de los parámetros de fermentación en el contenido de compuestos bioactivos del cacao	56
2.4. MICROORGANISMOS DE FERMENTACION DE CACAO	58
2.4.1. Levaduras	60
2.3.1. Género <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .	61
2.3.2. Bacterias	63
2.4. ENZIMA PECTOLITICA	66
2.5. COMPUESTOS BIOACTIVOS	67
2.5.1. Antioxidantes	67
2.5.2. Polifenoles	68
2.6. CALIDAD DEL CACAO	70
2.6.1. Calidad según grado de fermentación	71
2.6.2. Características sensoriales del cacao	74
2.7. MARCO CONCEPTUAL	77
2.8. HIPÓTESIS	77
2.8.1. General	77
2.8.2. Específicos	78
CAPITULO III: METODO	79
3.1. TIPO Y NIVEL DE INVESTIGACION	79
3.2. DISEÑO DE LA INVESTIGACION	79
3.3. ETAPAS DE LA INVESTIGACION	82
3.3.1. Descripción del proceso experimental	83
3.3.2. Métodos de análisis	85
3.4. ESTRATEGIAS DE PRUEBA DE HIPÓTESIS	88
3.5. VARIABLES EN ESTUDIO	88

3.5.1. Variables independientes	88
3.5.2. Variables dependientes	88
3.6. POBLACION	88
3.7. MUESTRAS	89
3.8. TECNICAS DE INVESTIGACION	89
3.8.1. Instrumentos de recolección de datos	89
3.8.2. Instrumento de recolección de información en laboratorio	89
3.8.3. El procesamiento y análisis de datos	91
CAPITULO IV: PRESENTACION DE RESULTADOS	92
4.1. CARACTERIZACION DEL CACAO	92
4.2. CARACTERISTICAS FISICOQUIMICAS DURANTE PROCESO DE FERMENTACION DEL CACAO	93
4.2.1. Temperatura de fermentación	94
4.2.2. pH durante de la fermentación	95
4.2.3. Acidez titulable en la fermentación	98
4.2.4. Contenido de solidos solubles en fermentación del cacao	101
4.2.5. Contenido de alcohol en fermentación del cacao	103
4.2.6. Humedad del cacao en la fermentación	104
4.2.7. Contenido de ácido acético	105
4.3. VARIACIÓN DE CONTENIDO DE COMPUESTOS BIOACTIVOS POR PROCESO DE FERMENTACION DEL CACAO	107
4.3.1. Capacidad antioxidante	107
4.3.2. Contenido de polifenoles totales	108
4.3.3. Contenido de teobromina	109
4.4. EVALUACION DE LA CALIDAD DEL GRANO FERMENTADO Y SECO	111

4.4.1. Evaluación física del grano fermentado seco	111
4.4.2. Grado de fermentación del cacao	112
4.4.3. Características microbiológicas de la fermentación	119
4.4.4. Calidad sensorial del cacao	121
<b>CAPITULO V: DISCUSION</b>	<b>132</b>
<b>5.1. CARACTERIZACION DEL CACAO</b>	<b>132</b>
<b>5.2. CARACTERISTICAS FISICOQUIMICAS DURANTE           PROCESO DE FERMENTACION DEL CACAO.</b>	<b>133</b>
5.2.1. Temperatura de fermentación	133
5.2.2. pH durante de la fermentación	136
5.2.3. Acidez titulable en la fermentación	137
5.2.4. Contenido de solidos solubles en fermentación del cacao	139
5.4.5. Humedad del cacao en la fermentación	139
5.2.6. Contenido de alcohol en fermentación del cacao	140
5.2.7. Contenido de ácido acético	141
<b>5.3. VARIACIÓN DE CONTENIDO DE COMPUESTOS BIOACTIVOS           POR PROCESO DE FERMENTACION DEL CACAO</b>	<b>142</b>
5.3.1. Capacidad antioxidante	142
5.3.2. Contenido de polifenoles totales	143
5.3.3. Contenido de teobromina	144
<b>5.4. EVALUACION DE LA CALIDAD DEL GRANO FERMENTADO Y SECO</b>	<b>145</b>
5.4.1. Evaluación física del grano fermentado seco	145
<b>5.4.2. Grado de fermentación del cacao</b>	<b>146</b>
<b>5.4.3. Características microbiológicas</b>	<b>148</b>
<b>5.4.4. Calidad sensorial del cacao</b>	<b>149</b>

CONCLUSIONES	155
RECOMENDACIONES	157
REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	158
ANEXOS	179



## INDICE DE TABLAS

	Página
Tabla 1. Complejos germoplásmicos naturales de cacao	33
Tabla 2. Composición fisicoquímica del cotiledón de tres variedades de cacao.	35
Tabla 3. Composición fisicoquímica del grano fermentado seco y licor de cacao	36
Tabla 4. Participación de principales regiones productoras de cacao en el año 2013	38
Tabla 5. Algunos aspectos de los granos de cacao en el proceso de fermentación.	43
Tabla 6. Clasificación de granos fermentados para producción interna del país	70
Tabla 7. Clasificación de granos no fermentados para producción interna	71
Tabla 8. Categoría para clasificación de granos en la prueba de corte.	72
Tabla 9. Sabores presentes en la evaluación sensorial del licor de cacao	76
Tabla 10. Tratamientos de la investigación	80
Tabla 11. Características físicas del cacao cosechado fresco	92
Tabla 12. Características fisicoquímicas del cacao cosechado fresco	93
Tabla 13. Evaluación de la temperatura durante la fermentación	94
Tabla 14. Evaluación del pH de mucílago de cacao durante la fermentación	96
Tabla 15. Evaluación del pH del cotiledón de cacao durante la fermentación	97
Tabla 16. Evaluación de acidez del mucílago de cacao durante la fermentación	99
Tabla 17. Evaluación de acidez del cotiledón de cacao durante la fermentación	100
Tabla 18. Evaluación de sólidos solubles del mucilago de cacao durante la fermentación	102
Tabla 19. Evaluación de contenido alcohol en grano de cacao durante la fermentación	103
Tabla 20. Evaluación de la humedad en grano de cacao durante la fermentación	105

Tabla 21. Evaluación del contenido de ácido acético en la fermentación	106
Tabla 22. Variación de compuestos antioxidantes en el cacao	107
Tabla 23. Variación de polifenoles totales en el cacao	108
Tabla 24. Variación de contenido de teobromina (%) en el cacao	110
Tabla 25. Rendimientos de cotiledón y cascarilla del cacao	111
Tabla 26. Rendimientos de peso promedio del cacao	111
Tabla 27. Contenido de ceniza y humedad (%)	112
Tabla 28. Prueba de comparaciones de Tukey de granos pizarra a una confianza de 95%	117
Tabla 29. Prueba de comparaciones de Tukey de granos violeta a una confianza de 95%	117
Tabla 30. Prueba de comparaciones de Tukey de fermentación parcial a una confianza de 95%	118
Tabla 31. Prueba de comparaciones de Tukey de % de fermentación a una confianza de 95%	118
Tabla 32. Población de levaduras por fermentación	119
Tabla 33. Población de mohos por fermentación	120
Tabla 34. Población de bacterias acéticas por fermentación	121
Tabla 35. Características sensoriales de los tratamientos en estudio	122
Tabla 36. Prueba de Comparaciones de Tukey de Olor/fragancia, confianza de 95%	127
Tabla 37. Prueba de comparaciones de Tukey de acidez a una confianza de 95%	127
Tabla 38. Prueba de comparaciones de Tukey de amargor a una confianza de 95%	128
Tabla 39. Prueba de comparaciones de Tukey de astringencia, a una confianza de 95%	128
Tabla 40. Prueba de comparaciones de Tukey de sabor/aroma, a una confianza	129

de 95%

Tabla 41. Prueba de comparaciones de Tukey de limpieza, a una confianza 130

de 95%

Tabla 42. Prueba de comparaciones de Tukey de post gusto, a una confianza 130

de 95%

Tabla 43. Prueba de comparaciones de Tukey de puntaje de catador, a una 131

confianza de 95%

## INDICE DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Producción nacional de cacao hasta el año 2016	37
Figura 2. Perú, Producción y rendimiento de cacao	39
Figura 3. Glucólisis	45
Figura 4. Fermentación Alcohólica	46
Figura 5. Glucolisis de formación de alcohol	47
Figura 6. Oxidación de etanol a ácido acético	49
Figura 7. Esquema de sucesión microbiana durante la fermentación de cacao	58
Figura 8. Diagrama de flujo para la evaluación del efecto de la adición de enzima pectolítica y levadura <i>Saccharomyces cerevisiae</i> en la fermentación y calidad del cacao.	83
Figura 9. Tendencia de la temperatura durante la fermentación del cacao	95
Figura 10. Tendencia del pH del mucílago de cacao durante la fermentación	95
Figura 11. Tendencia del pH del cotiledón de cacao durante la fermentación	97
Figura 12. Tendencia de acidez del mucílago de cacao durante la fermentación	99
Figura 13. Tendencia de acidez del cotiledón de cacao durante la fermentación	100
Figura 14. Tendencia de solidos solubles del cotiledón de cacao durante la fermentación	102
Figura 15. Tendencia de contenido de alcohol en granos de cacao durante la fermentación	103
Figura 16. Tendencia del contenido de humedad en granos de cacao durante la fermentación	105
Figura 17. Tendencia del contenido de ácido acético en granos de cacao durante la fermentación	106

Figura 18. Características de variación de capacidad antioxidante (ug Etrolox/mg cacao) del cacao por efectos de la fermentación	108
Figura 19. Características de variación de contenido de polifenoles totales (mg EAG/mg cacao) del cacao por efectos de la fermentación	109
Figura 20. Características de variación de contenido de teobromina (%) del cacao por efectos de la fermentación.	110
Figura 21. Grado de fermentación de tratamiento L1.	113
Figura 22. Grado de fermentación de tratamiento L2	113
Figura 23. Grado de fermentación de tratamiento LE1	114
Figura 24. Grado de fermentación de tratamiento LE2	114
Figura 25. Grado de fermentación de tratamiento E1	115
Figura 26. Grado de fermentación de tratamiento E2	116
Figura 27. Grado de fermentación de tratamiento T	116
Figura 28. Atributo sensorial del Tratamiento L1	121
Figura 29. Atributo sensorial del Tratamiento L2	124
Figura 30. Atributo sensorial del Tratamiento LE1	124
Figura 31. Atributo sensorial del Tratamiento LE2	125
Figura 32. Atributo sensorial del Tratamiento E1	125
Figura 33. Atributo sensorial del Tratamiento E2	126

## RESUMEN

El objetivo de esta investigación fue identificar los efectos de la enzima pectolítica y levadura *Saccharomyces cerevisiae* en las características de fermentación del cacao, en la calidad fisicoquímica y sensorial. Como unidad experimental se tuvo 3.5 kg/tratamiento, de cacao tipo criollo; se establecieron seis tratamientos: dos fueron con adición de cepas de levadura *Saccharomyces Cerevisiae* al 0.05 y 0.10 %, dos con adición de mezcla de levadura y enzima pectolítica y dos tratamientos con adición de enzima pectolítica de 0.07 y 0.14 ml/tratamiento. La fermentación fue por 144 horas, analizados cada 24 horas de fermentación, las características fisicoquímicas y microbiológicas, al finalizar la fermentación se secaron por 3 días, hasta lograr humedad final de 7 %.

Los resultados mostraron que en el proceso de fermentación los tratamientos con adición de solo enzima pectolítica desarrollaron mejor perfil sensorial, alcanzando una calidad de cacao especial fino con 80.33 puntos y cacao especial con 77.33 puntos, en relación al tratamiento testigo que alcanza 75.67 puntos. La adición de levadura *Saccharomyces cerevisiae* en la fermentación de cacao no aporta beneficios en la calidad del grano fermentado, puesto que una gran población de levaduras agota rápidamente el sustrato del mucilago, acelerando la fermentación alcohólica y desarrolla mayor actividad de la fermentación láctica y acética, logrando una buena fermentación de grano, con menor perfil sensorial. La variabilidad de capacidad antioxidantes, contenido de polifenoles y de teobromina, durante la fermentación no es significativo por adición de enzima y levadura.

**PALABRAS CLAVES:** Cacao, Fermentación alcohólica, fermentación láctica, fermentación acética, polifenoles, capacidad antioxidante, teobromina, perfil sensorial.

## ABSTRACT

The objective of this research was to identify the effects of the pectolytic enzyme and yeast *Saccharomyces cerevisiae* on the fermentation characteristics of cocoa, on the physicochemical and sensory quality. As an experimental unit, we had 3.5 kg / treatment, of Creole type cocoa; six treatments were established: two were with the addition of 0.05 and 0.10% *Saccharomyces cerevisiae* yeast strains, two with addition of yeast mixture and pectolytic enzyme and two treatments with pectolytic enzyme addition of 0.07 and 0.14 ml / treatment. The fermentation was for 144 hours, analyzed every 24 hours of fermentation, the physicochemical and microbiological characteristics, at the end of the fermentation they were dried for 3 days, until achieving final humidity of 7%.

The results showed that in the fermentation process treatments with the addition of only pectolytic enzyme developed a better sensory profile, reaching a quality of special fine cocoa with 80.33 points and special cocoa with 77.33 points, in relation to the control treatment that reaches 75.67 points. The addition of yeast *Saccharomyces cerevisiae* in the fermentation of cocoa does not provide benefits in the quality of the fermented grain, since a large population of yeasts rapidly depletes the mucilage substrate, accelerating the alcoholic fermentation and develops greater activity of lactic and acetic fermentation, achieving a good grain fermentation, with a lower sensory profile. The variability of antioxidant capacity, content of polyphenols and theobromine, during fermentation is not significant by the addition of enzyme and yeast.

**KEY WORDS:** Cocoa, alcoholic fermentation, lactic fermentation, acetic fermentation, polyphenols, antioxidant capacity, theobromine, sensory profile.

## INTRODUCCION

El cacao pertenece al género *Theobroma* que en griego significa Alimento de los Dioses (León, 2000). El cacao (*Theobroma cacao* L.), es una especie tropical nativa de las selvas del Amazonas, en la zona comprendida entre Venezuela, Ecuador, Brasil, Perú y Cuencas del Orinoco, en Sudamérica. Cultivándose principalmente dos variedades: Criollos hacia el Norte y Forasteros hacia el sur, luego se cruzaron y dieron origen a la variedad Trinitario y diferentes clones (Enríquez, 1982). Perú posee una amplia variabilidad genética, caracterizándose la región Junín, por poseer híbridos de cacao criollo, trinitario y/o cruces de trinitario con forastero (Loayza, 2014).

El cacao es un producto sustituto al cultivo de coca, en el valle del Huallaga y el VRAEM, que ha impulsado que miles de familias transformen sus cultivos e ingresen a una economía lícita, (Agraria, 2013). El cacao, cultivado en reemplazo de cultivos de hoja de coca en muchas regiones del país, se está consolidando en los mercados internacionales. Un 70% del cacao peruano se exporta. Consolidándose el Perú como el segundo exportador mundial de cacao orgánico (APPCACAO, 2012)

La calidad del cacao radica principalmente en la etapa de pos cosecha, principalmente en la fermentación donde los granos de cacao desarrollan una serie de transformaciones bioquímicas que favorecen la calidad organoléptica; semillas son metabolizadas por microorganismos que producen compuestos como el etanol y ácido acético, que promueven cambios fisicoquímicos importantes en las almendras (Navia & Pazmiño, 2012). La calidad es el aspecto de mayor importancia en el proceso productivo cacaotero, determina la demanda comercial del cacao en grano. El logro de cacao de alta calidad exige una serie de requisitos como tipo de suelo, sistema agrícola y tecnología de post cosecha, como la fermentación y secado (Enríquez, 1982). La calidad del cacao



fermentado depende de factores como variedad o tipo de cacao, tipo de fermentador, cantidad de masa a fermentar, frecuencia de remoción y sólidos solubles iniciales en el mucilago (Alas y Ríos, 2012).

Está demostrado que el cacao y sus productos: pasta de cacao o licor de cacao, chocolate amargo, polvo de cacao o cocoa, son alimentos ricos en sustancias bioactivos, principalmente en catequinas (epicatequina, epigallocatequina, galocatequina y catequina), además de otros flavonoides como las procianidinas, antocianinas, flavononas y flavonolglucosídicos; benéficos para la salud (Rivera *et al*, 2011; Cadena, 2008).

Para el desarrollo de esta investigación, se consideró que la adición de levadura *Saccharomyces cerevisiae* y enzima pectolítica, mejoraría la calidad del cacao en el proceso de fermentación, donde las levaduras durante el proceso metabólico producen compuestos precursores de sabores y aromas en el grano de cacao, que durante el tostado se desarrollan los aromas y sabores del chocolate; por ello, primeramente se identificó el fundo cacaotero donde se cultiva ecotipos de variedad criollo, en la provincia de Satipo. Se determinó como unidad experimental 3.5 kg de masa de cacao en baba por tratamiento, a fin de evaluar las características adecuadas fisicoquímicas, microbiológicas y sensoriales. Se establecieron seis tratamientos, adicionando L1: 0.05 %, L2: 0.1 % de levadura; LE1: 0.05 % de levadura + 0.07 ml de enzima, LE2: 0.1 % de levadura + 0.14 ml de enzima; E1: 0.07 y E2: 0.14 ml de enzima. La temperatura ambiente de la fermentación varió de 25 a 30 °C, con remoción diaria luego de las 48 horas de fermentación, con evaluaciones diarias, siendo el tiempo de fermentación de 132 a 144 horas; al final de la fermentación se realizó el secado en bandejas por los rayos solares en tres días a temperatura ambiente de 25 a 34 °C, para los análisis finales.

El uso de cultivos iniciadores en la fermentación mejora el proceso y calidad del grano de cacao y por ende de sus derivados (De Vuyst y callebaut, 2010). La enzima pectolítica actúa en la fermentación del cacao en baba degradando la pectina, liberando los granos del mucílago que envuelven cada cotiledón. Los resultados demuestran que los tratamientos con adición de enzima pectolítica al inicio de la fermentación mejora la calidad sensorial del cacao como el tratamiento E2: 80.33 puntos de calificación, que lo clasifica como cacao especial fino (APPCACAO, 2016), el tratamiento E1 obtiene 77.33 puntos calificado como cacao especial, en relación al tratamiento testigo que obtiene 75.67 puntos. Asimismo reduce el tiempo de fermentación (132 horas), en relación al testigo y demás tratamientos (144 horas). Las pruebas sensoriales identificaron que la fermentación con la adición de la enzima polifenol oxidasa (PPO), logró obtener los mejores resultados en cuanto perfil sensorial, sabor a floral, frutal y nuez en cuando al sabor (Morales *et al.*, 2016).

La incorporación de enzima pectinolítica en la fermentación mejora la calidad sensorial del cacao. Son importantes los estudios a fin de mejorar la calidad del cacao en la etapa de fermentación, puesto que beneficia a los cacaoteros, para acceder a mejores mercados y mejores precios, que incida en mejor calidad de vida del cacaotero.

## CAPITULO I

### PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

#### 1.6. ANTECEDENTES

Alas y Rios, (2012), en la investigación “*Evaluación del proceso de fermentación tradicional y no tradicional de la semilla de cacao Theobroma cacao del Ecotipo Acriollado*”, mencionan que para la determinación de factores físicos-químicos y microbiológicos, empleando cuatro medios de cultivos y levadura *Saccharomyces cerevisiae* como iniciadores de fermentación en el método no tradicional, valoraron la fermentación del cacao usando cuatro medios de cultivo: 1: agar MRS, 2: agar estándar, 3: medio de ácido acético-etanol Rutherford (RAE) y 4: agar dextrosa sabouraud; en que el medio RAE contiene levadura *Saccharomyces cerevisiae*, a fin de determinar el efecto de la adición de levaduras y sacarosa para mejorar la calidad de las características sensoriales de la especie de *Theobroma cacao* de tipo acriollado. Efectuaron análisis bromatológicos para determinar la cantidad de Cenizas, Fibra, Grasa, Humedad y Proteína presentes en los experimentos: fermentación tradicional y fermentación con adición de medios de cultivo; mostrando mejores resultados la fermentación con medio de cultivo RAE.

El cacao con fermentación tradicional presenta: fibra 24,36 %, humedad 5,81 %, proteína 11,17 %, grasa 20,63 %; en el cacao fermentado con adición de medio de cultivo RAE se obtuvo los siguientes resultados: fibra 24,76 %, humedad 4,57 %, proteína 12,07 %, grasa 21,09 %; entonces el cacao fermentado con cultivo RAE obtuvo mejores características físico-químicas.

Asimismo Navia y Pazmiño (2012), en la investigación “*Mejoramiento de las características sensoriales del Cacao CCN51 a través de la adición de enzimas durante el proceso de fermentación*”, tuvieron como finalidad trabajar dentro de la etapa de fermentación para reducir las cualidades negativas del cacao de este clon, como: acidez, amargor y astringencia, mediante la adición de enzimas: polifenoloxidasas presente en la piña y una proteasa comercial Prozyn flavour, y conseguir mejorar la calidad organoléptica de este grano. La enzima polifenoloxidasas se emplea a fin de que actúen en la fase primaria de la fermentación y la enzima Prozyn flavour a fin de incrementar la producción de precursores de sabor.

Asimismo en cuanto a la mejora de las características sensoriales afirman, que el cacao CCN51 fermentado con enzima Prozyn presenta mejores cualidades sensoriales que los tratamientos sin enzima y con la enzima polifenoloxidasas de piña, igualmente en cuanto a la acidez percibido sensorialmente, el tratamiento con enzima Prozyn posee mejor cualidad, cercano a 3 puntos. De acuerdo al procesamiento estadístico el tratamiento con enzima Prozyn establece diferencia significativa respecto al tratamiento sin adición de enzima y fermentado con enzima polifenoloxidasas de piña; entonces la calidad sensorial del cacao CCN51 tratado con enzima Prozyn mejora significativamente, sin embargo no iguala a las características sensoriales del cacao variedad criollo (Nacional de los Ríos).

De Vuyst y Callebaut (2010), en la investigación “*Uso de cultivos iniciadores en la fermentación del cacao (Theobroma cacao)*”, menciona que cuando la fermentación es natural, algunos microorganismos no deseables del entorno penetran en los granos del cacao, dando mal sabor al chocolate. Para encontrar una solución a esta problemática plantea el uso de cultivos iniciadores podría permitir la fermentación de los granos de

cacao para producir chocolate con un perfil de sabor más consistente, independientemente de la región productora del cacao y el método de fermentación. , asimismo afirma que la adición de un cultivo iniciador constituido por levaduras, bacterias ácido lácticas (BAL) y bacterias ácido acéticas (BAA), permitiría a los productores de cacao estandarizar el proceso de fermentación y evitar la variabilidad de la fermentación que permite desviaciones de sabor y inestabilidad de las características sensoriales que se presenta en el caso de fermentaciones espontáneas del grano de cacao.

En comparación con la fermentación espontánea de los granos de cacao, este estudio indica la importancia de la confiable mejora en el proceso de fermentación a través del uso de cultivos iniciadores, los cuales pueden brindar granos de cacao secos y fermentados de gran calidad de una manera consistente”, dijeron De Vuyst y sus colaboradores.

Morales et al., (2016), en la investigación “*Mejoramiento de las características físico-químicas y sensoriales del cacao CCN51 a través de la adición de una enzima y levadura durante el proceso de fermentación*”, establece el objetivo de la investigación se orientó en el mejoramiento de las características físico-químicas y sensorial del cacao CCN-51 con la adición de la enzima PPO (polifenol oxidasa) y levaduras (*Saccharomyces cerevisiae*). Se utilizó un Diseño Completo Aleatorizado (DCA) con ocho tratamientos y 3 repeticiones. Las variables estudiadas fueron prueba de corte, aroma, sabor, porcentaje de fermentación, porcentaje teobromina, porcentaje de acidez, humedad y pH., en los laboratorios de INIAP-Pichilingue y Santa Catalina. El proceso de fermentación se realizó durante 5 y 7 días en cajas de laurel (*Cordia alliodora*), las temperaturas alcanzaron valores entre 31°C a 46 °C, desempeñando un papel importante en la muerte del embrión de las habas de cacao y en las reacciones bioquímicas en los tejidos del cotiledón. Posteriormente se procedió con el

secado al sol en tendal de cemento cubierto de plástico durante 6 días hasta alcanzar un porcentaje promedio de humedad de 3,16%. Los resultados muestran que la adición de la levadura (*Saccharomyces cerevisiae*) y el PPO mejoran las características físicas-químicas y sensoriales en comparación con el testigo; además se estableció que la concentración de teobromina se redujo a 1.46% al utilizar el PPO durante siete días de fermentación

Wacher (2011), en la investigación “*Microorganismos y chocolates*”, menciona que la fermentación del cacao es un proceso complicado, puesto que intervienen muchos microorganismos que actúan de manera secuencial (unos después de otros) para modificar el grano; en la primera fase aparecen de 5 y 6 especies diferentes de levaduras, que luego desaparecen dejando su lugar a la levadura *Hanseniaspora guilliermondii*, que predominante durante las primeras 24 horas, a *Hanseniaspora* sólo se le encuentra ocasionalmente en las fases posteriores; Se reporta que a las 36-38 horas dominan *Saccharomyces cerevisiae* y *Pichia membranaefaciens*, que se encuentra al final de la fermentación. En la segunda fase del proceso de fermentación del cacao, se desarrolla las bacterias lácticas, que fermentan los carbohidratos residuales y agotando el ácido cítrico presente en el sustrato; en este proceso de fermentación se han aislado bacterias del tipo *Lactobacillus* (*Lb. collonides*, *Lb. fermentum*, *Lb. mali* y *Lb. plantarum*), aunque también se han identificado bacterias como *Leuconostoc pseudomesenteroides*, *Leuconostoc pseudoficulneum*, y *Pediococcus acidilactici*, asimismo el *Lb fermentum* y *Lb plantarum* que son indígenas de esta fermentación. Igualmente las levaduras producen en su metabolismo enzimas tipo pectinolítico, que permite hidrolizar las pectinas presentes, desapareciendo el mucilago. En la tercera fase del proceso de fermentación se produce un cambio importante, donde intervienen bacterias acéticas que transforman el etanol que produjeron las levaduras, en ácido acético. El etanol y el ácido acético se difunden hacia el

interior de los granos y, junto con la temperatura alta, matan al embrión. Las más importantes bacterias acéticas que se han aislado de la fermentación del cacao, son: *Gluconobacter oxydans*, *Acetobacter aceti* y *Acetobacter pasteurianus*.

En la cuarta y última fase de la fermentación, que se desarrolla entre las 48 y las 60 horas, se identificaron bacterias del género *Bacillus*, al hacer los volteos de los granos, se favorece la presencia, en las partes externas, de bacterias: *B. licheniformis*, *B. megaterium*, *B. pumilus* y un grupo pequeño de bacterias: *B. subtilis*, *B. megaterium* y *B. pumilus*; estas bacterias producen numerosas enzimas, que catalizan reacciones cuyos productos dan al cacao sabores y olores desagradables, por lo que se debe evitar el desarrollo de estas bacterias no deseables para lograr una buena calidad de grano fermentado. A la acción de los microorganismos se agrega la de las enzimas de la planta y los efectos físicos y químicos de las operaciones posteriores (por ejemplo el rostizado y el secado), para dar lugar al sabor y al color del producto. El consumo de sustratos y la producción de metabolitos fueron similares a los reportados para las fermentaciones tradicionales, con la única desventaja de que no se mezclaron los granos de manera eficiente

Zapata, Tamayo y Alberto (2013), en la investigación “*Efecto de la fermentación sobre la actividad antioxidante de diferentes clones de cacao colombiano*”, donde establecieron como objetivo: evaluar el efecto de la fermentación sobre el contenido de metabolitos secundarios y la actividad antioxidante en 5 clones de cacao cultivados en Colombia. Asimismo mencionan que el efecto de la fermentación sobre los clones de cacao no fue uniforme, presentándose cambios positivos y negativos en los contenidos de los diversos metabolitos secundarios, de acuerdo a la variedad. En los clones ICS 1 e ICS 95, los fenoles totales aumentaron después de la fermentación en 42 y 54 %, respectivamente, en

cambio en ICS 60 y TSH 565, hubo una disminución de 20 y 35 %. La evolución del contenido total de compuestos fenólicos durante la fermentación no es igual, en el caso de los clones ICS 60 y TSH 565, hay pérdidas de fenoles totales que son debidas a la difusión de los polifenoles fuera de los cotiledones durante la fermentación. En el caso de CCN 51 ICS 1 y ICS 95 hay incremento en contenido fenólico. Además, los compuestos fenólicos pueden acomplejarse con proteínas, polisacáridos y alcaloides del cacao. Asimismo, el incremento de los polifenoles durante el proceso de fermentación puede reflejar una formación de proantocianidinas poliméricas (taninos).

Por otra parte, las antocianinas son los pigmentos más importantes de las plantas vasculares, estos pigmentos solubles en agua son muy inestables y sensibles a la degradación, durante la fermentación de los granos de cacao, las antocianinas son hidrolizadas por acción de las glicosidasas, que originan el blanqueamiento de los cotiledones. Estas enzimas hidrolizan el enlace glicosídico de las antocianinas y producen azúcar y aglicona, que reduce así el contenido de antocianinas. Las metilxantinas están distribuidas en las diferentes partes de la semilla del cacao, en el grano, la pulpa y cubierta; durante la fermentación la disminución del contenido de teobromina y cafeína se debe principalmente a la difusión de estos alcaloides con los líquidos celulares y al genotipo evaluado. Asimismo, el contenido de cada metilxantina es mayor durante los primeros días de fermentación y disminuye progresivamente durante el tiempo de fermentación. Sin embargo, teniendo en cuenta la alta permeabilidad de la cubierta del grano de cacao, permite que los alcaloides penetren a través de la cubierta, que sean acumulados y, por tanto, aumentar su contenido.



## 1.2. Planteamiento del problema

En el Perú el cultivo del cacao *Theobroma cacao L.*, tiene una connotación socio-económica muy importante, constituyéndose como uno de los principales cultivos sustitutos del cultivo de la coca en muchas zonas de la selva Peruana y como un cultivo atractivo y rentable de la agricultura nacional, involucra 75.000 familias productoras e indirectamente a 500,000 familias, cultivando 112290 Ha y una producción de 69678 Tm (MINAGRI., 2014). Asimismo las exportaciones de cacao y derivados viene creciendo sostenidamente cada año en el 2013 de exportó 47221 Tm, por un valor de US \$ 119275,375 dólares, siendo los principales destinos Alemania, Italia, Holanda, Bélgica, Suiza y Estados Unidos (Aduanas 2014).

Junín viene constituyéndose en una de las regiones principales productores de cacao en Perú, el año 2013 participa en la producción de 9835 tm, que es el 13.7 % de la producción nacional, siendo la tercera región en producción a nivel nacional, la mayor producción corresponde a la provincia de Satipo, luego Chanchamayo. El cacao producido en esta región mayormente es la variedad criollo. (MINAGRI., 2014).

En Junín gran porcentaje de agricultores no desarrollan adecuadamente las prácticas de postcosecha, principalmente una correcta fermentación de los granos de cacao, lo que resta la calidad a este grano (Otárola et al, 2010), en Junín este cultivo viene creciendo considerablemente, principalmente por la rentabilidad y el prestigio que viene ganando el Perú como productor de cacao de alta calidad (criollo y nativo) para el mundo y a la demanda aun insatisfecha en el mercado internacional y nacional.

Por otro lado un factor que obstaculiza el desarrollo de la cadena productiva regional del cacao, la imposibilidad de estandarizar los perfiles de aroma y sabor del mismo durante los procesos de beneficio, como el caso de una mala práctica de fermentación, teniendo en cuenta que las características fisicoquímicas y organolépticas del grano regional son interesantes y demandan por lo tanto del desarrollo de procesos de fermentación y secado adecuado y que puedan ser adaptados a las exigencias de los mercados especializados. De manera que el cacaocultor de Junín necesita de herramientas tecnológicas con las que pueda alcanzar niveles de productividad y calidad que lo hagan competitivo frente a productores de otras regiones del Perú y del mundo y por lo tanto mejoren sus condiciones socioeconómicas y calidad de vida.

El cacao es una de las principales fuentes de polifenoles, estos compuestos se encuentran relacionados con la actividad antioxidante y las características organolépticas del cacao y sus subproductos que en parte se desarrolla durante la fermentación, donde se forman estos metabolitos.(Chávez y Ordoñez 2013). El tiempo de fermentación transcurre normalmente de 4 a 6 días lo que genera un cuello de botella en el proceso de post-cosecha, que incide directamente en el periodo de cosecha, a fin de fermentar mayor cantidad de cacao muchos agricultores cortan este proceso afectando la calidad de este grano para producto final. Por lo que se plantea los siguientes problemas:

### **Problema general**

¿Cómo interviene la enzima pectolítica y levadura *Saccharomyces Cereviseae* en la fermentación y calidad del cacao?

## **Problemas específicos**

¿Cómo influye la fermentación con enzima pectolítica y levadura *saccharomyces cereviseae* en el contenido de compuestos bioactivos del grano de cacao?

¿Cuáles son las características de la fermentación de cacao con enzima pectolítica y levadura *Saccharomyces cereviseae*, para obtener grano de cacao que cumpla los estándares de calidad internacional?

¿Cuál es la aceptación de la pasta de cacao a partir de grano fermentado con enzima pectolítica y levadura *Saccharomyces cereviseae*?

## **1.3. Objetivos**

### **Objetivo general**

Identificar los efectos de la enzima pectolítica y levadura *Saccharomyces cereviseae* en las características de fermentación del cacao y en la calidad fisicoquímica y sensorial de esta.

### **Objetivos específicos**

- Evaluar las características de la fermentación del cacao con enzima pectolítica y levadura *Saccharomyces cereviseae* y su efecto en el contenido de compuestos bioactivos del grano.
- Identificar las características de la fermentación del cacao con enzima pectolítica y levadura *Saccharomyces cereviseae*, para obtener granos de cacao que cumpla los estándares de calidad internacionales
- Evaluar la aceptabilidad de la pasta de cacao a partir de grano fermentado mediante enzima pectolítica y levadura *Saccharomyces cereviseae*

## **1.4. Justificación e importancia**

### **Justificación**

La buena calidad del cacao no sólo depende de su variedad, sino también en gran medida del proceso post-cosecha al cual es sometido. Procesos como la fermentación y secado, en conjunto con el proceso tecnológico del tostado del cacao para la obtención de un chocolate de calidad son de fundamental importancia. La pequeña industria de chocolates en el Perú, presentan productos de diferentes calidades organolépticas aún de no muy buena aceptación; básicamente por no desarrollar adecuadamente el proceso de fermentación y secado del grano, pues en esta operación se desarrollan los precursores del sabor a chocolate tales como los aminoácidos libres, péptidos y azúcares reductores; los mismos que interactúan en el proceso de fermentación, produciendo los componentes específicos del aroma y sabor a chocolate, tales como alcoholes, tiazoles, éteres, fenoles, furanos, ácidos, pironas, ésteres, aldehídos, cetonas, iminas, aminas, oxazoles, pirazinas y pirroles que contribuyen a una agradable impresión sensorial (Zapata, *et al.*, 2013; Suazo, 2012).

En los últimos años diversos autores han demostrado que el cacao y sus productos: pasta de cacao o licor de cacao, chocolate amargo, polvo de cacao o cocoa, son alimentos ricos en estas sustancias, principalmente en catequinas (epicatequina, epigallocatequina, galocatequina y catequina), además de otros flavonoides como las procianidinas, antocianinas, flavononas y flavonolglicosídicos (Rivera *et al*, 2011; Cadena, 2008).

Últimamente se observa el creciente interés por el consumo de alimentos que además de nutrir tengan un impacto favorable en la salud, asimismo existe mucha expectativa en el estudio de componentes naturales como los polifenoles presentes en plantas y frutos,

genera especial atención debido a sus propiedades funcionales como antioxidantes, anticancerígenos, antiinflamatorios, antitrombóticos, antimutagénicos, antibacteriales y analgésicos. Por ello y los precios internacionales crecientes de este producto, el cacao en la región Junín, genera expectativa como un cultivo rentable, sustituto al cultivo de la coca, cultivo de café; principalmente con una gran demanda insatisfecha en el mercado externo, que implica mejorar la productividad y calidad de este fruto, con técnicas que sean aplicables por los cacaoteros a fin de obtener mejores rentabilidades y reconocimientos que posicionen sosteniblemente en el mercado el cacao de Selva central.

### **Importancia**

La Comisión Nacional de Productos Bandera (COPROBA) organismo adscrita al Ministerio de Comercio Exterior y Turismo (MINCETUR), declaró al cacao como producto bandera del Perú, debido a su origen, características diferenciales, ventajas comparativas y la imagen del Perú como país generador de productos de calidad con valor agregado. Dicho anuncio fue publicado el día 6 de noviembre del 2013; En ese sentido, esta comisión contemplo y ponderó para otorgar el reconocimiento, el hecho de que se trate de un producto sustituto al cultivo de coca, lo que ha impulsado que miles de familias transformen sus cultivos e ingresen a una economía lícita, (Agraria, 2013). Asimismo en el Foro de las Américas 2013, se menciona que gracias a la estrategia de mercado impulsado por el gobierno y privados, el cacao peruano, utilizado en las iniciativas de reemplazo de cultivos de hoja de coca en el país (el principal ingrediente de la cocaína) se está consolidando en los mercados internacionales. Un 70% del cacao peruano se exporta. Asimismo tenemos un crecimiento sostenido de la producción de 15% anual”, dijo Rolando Herrera, presidente de la Asociación Peruana de Productores de Cacao

(APPCACAO); donde el Perú se mantiene como el segundo exportador mundial de cacao orgánico. Además Quiñe agregó que el 2014 la producción de cacao alcanzó 81,300 toneladas distribuidas a lo largo 106,000 hectáreas, lo que generó alrededor de 7.7 millones de jornales anuales, beneficiando de manera directa a más de 90 mil familias, e indirecta a 450,000 mil personas (Gestión, 2015)

La producción de cacao de la Selva Central del Perú, en este caso de las provincias de Satipo y Chanchamayo, cada año viene desarrollándose apreciablemente, constituyéndose en uno de los productos más importantes para los negocios de exportación, y para mercado nacional. El uso de cultivos iniciadores en la fermentación mejora el proceso y calidad del grano de cacao y por ende de sus derivados como manifiestan (De Vuyst y callebaut, 2010). Asimismo las variedades de cacao, criollo y forastero amazónico Nacional y son las que principalmente predominan las plantaciones de cacao en Satipo y Chanchamayo, también existiendo la variedad CCN51 de Ecuador, que no posee buena calidad sensorial; la variedad de cacao criollo es conocido como “Sabor arriba”, se le ha conferido un reconocimiento mundial por sus marcadas características de aroma floral y frutal, sumamente apreciadas en la preparación de chocolates finos.

Frente a este problema, se plantea la posibilidad de que la actividad de beneficio de cacao principalmente la fermentación, incide directamente en la calidad de este grano, que afecta directamente en la economía del productor, por ello es importante desarrollar investigación sobre mejoras en la fermentación del cacao, tal es el uso de levadura *Saccharomyces cerevisiae* y enzima pectinolítica como cultivos iniciadores de la fermentación, a fin producir productos de buena calidad y aceptación del mercado exigente.

### **1.5. Alcances y limitaciones**

En la actualidad el mercado internacional del cacao es cada vez más exigente y en función a la calidad varía también el precio de compra; El Perú está considerado como el tercer país productor de cacao fino o aromático, principalmente por poseer variedades como criollo, trinitario y también el forastero que es de calidad baja. La calidad del cacao se va formando desde la etapa agrícola, en gran parte en la etapa de fermentación, donde intervienen muchos factores, posteriormente el secado. El cacao se clasifica de acuerdo a calidad por puntaje sensorial siendo: de 0 a 20 cacao pésimo, de 21 a 50 cacao corriente, de 50 a 70 cacao de calidad y de 70 a 90 cacao especial, sin embargo dentro de los especiales hay una sub categoría de 80 a 90 puntos cacao especial fino, que es el más apreciado y con mejores precios de compra. Esta investigación busca mejorar la calidad del cacao en la etapa de fermentación a fin de que el cacaotero acceda a mejores precios de compra, con los resultados obtenidos se ha logrado mejorar la calidad, mediante la adición de enzima pectinolítica a 0.04 ml/kg de cacao en baba, superando los 80 puntos, que permite afirmar que es una alternativa viable para mejorar la calidad del cacao en la fermentación. La limitante es la disponibilidad de la enzima pectinolítica, que debe socializarse a través de capacitaciones por medio del MINAGRI, universidades, organismos no gubernamentales a las cooperativas cacaoteras, asociaciones de productores y agricultores líderes.

## CAPITULO II

### MARCO TEORICO

#### 2.1. CACAO

Según el Ministerio de Agricultura y Riego del Perú – MINAGRI (2017), el cacao está teniendo un fuerte posicionamiento como producto de exportación, llegando a convertirse en uno de los principales productos exportables en los siguientes años, y adicionalmente se prevé un crecimiento anual desde el año 2014 del 15% en producción; consolidándose como uno de los mayores productores a nivel mundial, especialmente en cacao fino. Este fenómeno se ha generado gracias a la reconversión de cultivos en zonas amazónicas donde era común la producción de coca.

De acuerdo a Arévalo (2011), el árbol de cacao pertenece al género *Theobroma*, que, en griego, significa “alimento de los dioses”. Este género contiene varias especies, pero solamente una, *Theobroma cacao*, se cultiva comercialmente y es un cultivo de importancia económica para muchos agricultores de diferentes países que se dedican a este cultivo, a tal punto de convertirse en el eje del sistema productivo. La vasta mayoría (70% a 90%), la cultivan los pequeños agricultores cuyas plantaciones son menores de tres hectáreas, y el resto se cultiva en áreas mayores. El cacao es una planta de bosque, y ha evolucionado para crecer bajo condiciones de sombra. Rodríguez (2011), afirma que la planta de cacao alcanza hasta 7 m de altura y produce frutos en forma de bayas fibrosas con 10 surcos, entre 15 y 25 cm de largo, de 7.5 a 12 cm de diámetro, conteniendo entre 20 y 40 semillas. Cada una de estas, está cubierta de una pulpa suave llamada mucilago. De la Mota (2008), menciona que es un árbol tropical que crece sólo en climas tropicales húmedos, que necesita una temperatura constante de cerca de 24-28°C, lluvias abundantes y regulares, suelo rico en potasio, nitrógeno y oligo-elementos. El fruto es una baya o



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

### 2.1.1. Grupos germoplásmicos

Mediante estudios moleculares y argumentos paleo climáticos, paleo geográficos y etno botánicos, elaboró una propuesta de clasificación de grupos de cacao, estableciendo 5 grupos o complejos germoplásmicos naturales: Criollo, Amazonas o Forastero del Alto Amazonas, Guyanas o Forastero del Bajo Amazonas, y Nacional. Un tercer grupo, el ‘Trinitario’, resultó ser una población segregante que se originó de una cruce entre una variedad amelonada de la Guyanas (‘Forastero del Bajo Amazonas’) y una variedad de ‘Criollo’ de Venezuela, (Lachenaud, 1997),

**Tabla 1:**

*Complejos germoplásmicos naturales de cacao*

Grupo de cacao	Distribución geográfica
1. Criollo	América central, Colombia, Perú y Venezuela
2. Amazonas o Forastero del Alto Amazonas	Perú, Ecuador, Colombia, Bolivia y Brasil
3. Guyanas o Forastero del Bajo Amazonas	Guyanas, Venezuela, Surinam y Brasil
4. Nacional	Ecuador (zona costera)
5. Trinitario	Cruce de Forastero Bajo Amazonas y Criollo de Venezuela

Fuente: Lachenaud, 1997

Hall *et al.* (2010), mencionan otra clasificación tradicional de cacao, en tres grupos genéticos: Criollo, Forastero y Trinitario; sin embargo, nuevos estudios han mostrado que esta clasificación no describe suficientemente la variabilidad de la especie. Particularmente, el grupo Forastero abarca una alta variabilidad genética, mientras que las formas Criollo son genéticamente más estrechamente definidas. El grupo Trinitario comprende híbridos entre los dos primeros grupos. La mayoría de las formas de cacao cultivadas mundialmente hoy en día son híbridos de orígenes mixtos que no pueden ser completamente incluidos dentro de esta división clásica. Vega (2012), manifiesta que desde la época precolombina en América Central y luego de su difusión a América del Sur, Asia y África se han desarrollado distintas variedades, se realizó estudios genéticos del *Theobroma Cacao* L. e identificó tres variedades principales, Criollo, Forastero y Trinitario

Hoy en día se cultivan en Perú los cultivares tradicionales e híbridos de formas peruanas de Forastero con cultivares que se introdujeron en la segunda mitad del siglo XX. Estas familias de híbridos se han extendido a varios territorios de cultivo de cacao en Perú. Un estudio con 220 productores de cacao en el valle de Huallaga en Perú mostró una alta variabilidad genética dentro de las plantaciones de productores individuales y documentó que las formas utilizadas son híbridos de las formas Trinitario y Forastero de la cuenca superior del Amazonas (Doster *et al.*, 2011)

García (2012 b) menciona que en la zona norte del país existe una variedad denominada “porcelana” por el color blanco de las semillas (cacao blanco), caracterizada por presentar una marcada uniformidad fenotípica en el color de la mazorca, arquitectura del árbol, sabor a panela/malta. Esta variedad se cultiva en las provincias de Morropón y Huancabamba

(Piura), su origen probablemente se remonta a una variedad criolla que se cultiva en la zona vecina de San Ignacio (Cajamarca). Esta variedad obtuvo el primer lugar en el V Concurso Nacional de Cacao realizado en Lima en julio del 2011, debido principalmente a su buen sabor, acidez frutal, toques florales, gusto a buen chocolate, color muy atractivo y sabor agradable.

Asimismo la variedad Chunchu del Valle de La Convención (Cusco) tiene su origen en la variedad Forastero y criollo, de color blanco aromático a frutal de excelente calidad aromática (García, 2010 a).

### 2.1.2. Composición fisicoquímica del cacao

**Tabla 2:**

*Composición fisicoquímica del cotiledón de tres variedades de cacao.*

Variables	Variedades		
	Criollo	Forastero	Trinitario
Humedad	36.36	36.16	35.86
pH	6.39	6.36	6.35
Acidez total	0.31	0.31	0.35
Taninos (%)	0.68	0.80	0.72
Azúcares reductores (%)	3.02	3.24	2.90
Proteínas (%)	13.88	13.59	13.97
Cenizas (%)	3.67	3.59	3.63
Grasa (%)	50.99	49.52	52.24

Fuente: Graziani *et al.* (2003).

Los granos frescos de cacao, cubiertas por mucilago dulce y aromático que tiene aproximadamente 12 a 18 grados brix, asimismo contiene pectina y ácidos no volátiles. El

grano principalmente es amargo y de color violeta oscuro. Representa del 12 al 16 % del peso extraído de la mazorca, (López, 2016). Asimismo Graziani, *et al* (2003) establece la composición para granos frescos de cacao que se reporta en la tabla 2.

En la tabla 3, se reporta los valores de composición fisicoquímica de cacao criollo seco, determinado por (Adriazola, 2003).

**Tabla 3:**

*Composición fisicoquímica del grano fermentado seco y licor de cacao*

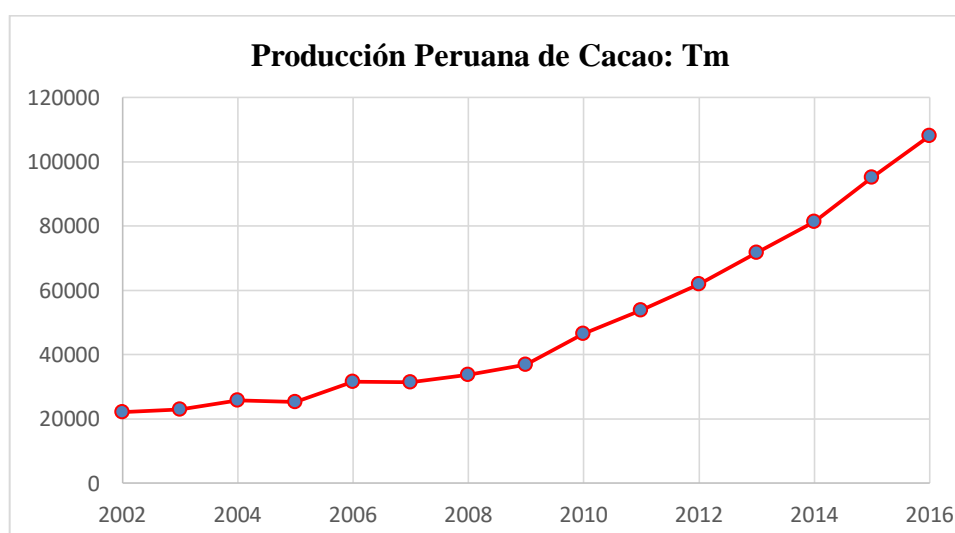
Variables	Grano seco	Licor de cacao
Humedad (%)	8.10	1.67
Proteína (%)	12.25	13.07
Grasa (%)	48.98	54.24
Fibra cruda (%)	4.30	3.67
Cenizas totales (%)	3.27	3.37
pH	5.91	5.39
Teobromina (%)	0.8 – 1.4	0.71 .1.5

Fuente Adriazola (2003).

Álvarez, Pérez y Lares (2007), determinaron las caracterización física y química de almendras de cacao fermentadas y secas, presentando un contenido de grasa cruda que varía entre 54,61 a 56,07% para los diferentes genotipos, proteína mostró un rango de variabilidad de 12,31 a 14,00%, respecto a la humedad se hallaron en un rango de 4,26 a 6,37%, igualmente se determinó los valores de cenizas 2,86 a 3,32%. Asimismo Vera *et al.*, (2014), determinaron en sus investigaciones que el grano de cacao está constituido químicamente por diferentes componentes como son grasa 54%, proteínas 11.5%, agua 7%, ceniza 2.6%.

### 2.1.3. Producción de cacao en el Perú

La producción peruana de cacao está creciendo a gran ritmo en los últimos años en promedio de 21,21%, lográndose una producción de 71813 tm, en el año 2013, luego un crecimiento anual promedio de 15 % anual hasta el año 2016; las regiones productoras principales de cacao en el Perú son: San Martín, Cusco, Junín, Ayacucho, Amazonas, Huánuco y Ucayali. Siendo la región San Martín el principal productor desde el año 2007, luego Cusco.



**Figura N° 1:** Producción nacional de cacao hasta el año 2016

Fuente: MINAGRI – Serie histórica de producción agrícola 2017

Como se muestra en la tabla 4, en el año 2013 Junín tuvo un incremento importante de superficie cosechada de 23.48%, respecto al año 2012, representando el 13.7 % de la producción nacional, creciendo al año 2016 al 17.2 % de la producción nacional, la región que más creció en cantidad producida de cacao; asimismo el rendimiento promedio nacional logrado el año 2013 fue de 736 kg/ha, en la región Junín se logró un rendimiento de 701 kg/ha y en el año 2016 fue 712 kg/ha, cercano al promedio nacional; sin embargo

en región San Martín se obtuvo rendimientos en fincas hasta 1560 kg/ha.(MINAGRI, 2017).

**Tabla N° 4:**

*Participación de principales regiones productoras de cacao en el año 2013*

Región	% de participación	
	2013	2016
San Martín	44.7	42.1
Cusco	14.3	14.6
Junín	13.7	17.2
Ayacucho	8.6	9.1
Amazonas	5.9	6.1
Huánuco	4.2	5.3
Otros	8.4	5.6

Fuente: MINAGRI- Series históricas 2017

Romero (2016), menciona que entre los años 2000-2008, la producción de cacao presentó un crecimiento anual (promedio) de un 4%; y en una segunda etapa, entre los años 2009 y 2015, muestra un incremento promedio anual de un 15,5%. En el año 2000 la producción de cacao en grano es de 24,8 mil toneladas y al año 2008 se había elevado a solo 34 mil toneladas (37% aumento entre ambos años). Sin embargo, a partir del 2009 se observa un fuerte crecimiento de la producción nacional, de manera que de 36,8 mil toneladas producidas en el 2009, se eleva en los siguientes años hasta las 87,3 mil toneladas en el 2015 (13.72 % de incremento entre ambos años). Gestión (2017), menciona que en el año 2016 permitió marcar otro récord de 129,842 hectáreas cultivadas de cacao, registrar una producción de 108,000 toneladas, que implica un crecimiento de 13.7 % respecto al año 2015, que fue de 95,000 toneladas. Este resultado se debió al trabajo coordinado entre el

sector público y el gremio de productores de cacao, Asociación Peruana de Productores de Cacao (APPCACAO), aunado al aporte de la cooperación internacional.

Hubo incremento de la producción nacional de cacao en grano, producto de la ampliación de las áreas cosechadas, aumentando éstas entre los años 2000 hasta el 2008 a una tasa promedio de 5,6 % por año. Al 2015 se alcanza una extensión de 121,3 mil hectáreas. La ampliación del área cosechada se sustenta en el impulso del cultivo de cacao como alternativa a la producción ilícita de la hoja de coca, principalmente en la zona del VRAEM, (Romero, 2016). Asimismo respecto al rendimiento de cacao kg/Ha, entre los años 2000 y 2009 fue de 500 Kg y 600 Kg, a partir del año 2010 se incrementa hasta 736 Kg en el año 2013. En el año 2014 se registra rendimiento de 766 Kg/Ha y en el 2015 disminuye el rendimiento medio a 720 kg/ha .La tasa de incremento anual promedio es de 4,4% entre los años 2009 y 2015, tal como se observa en la figura 2, (MINAGRI, 2017).

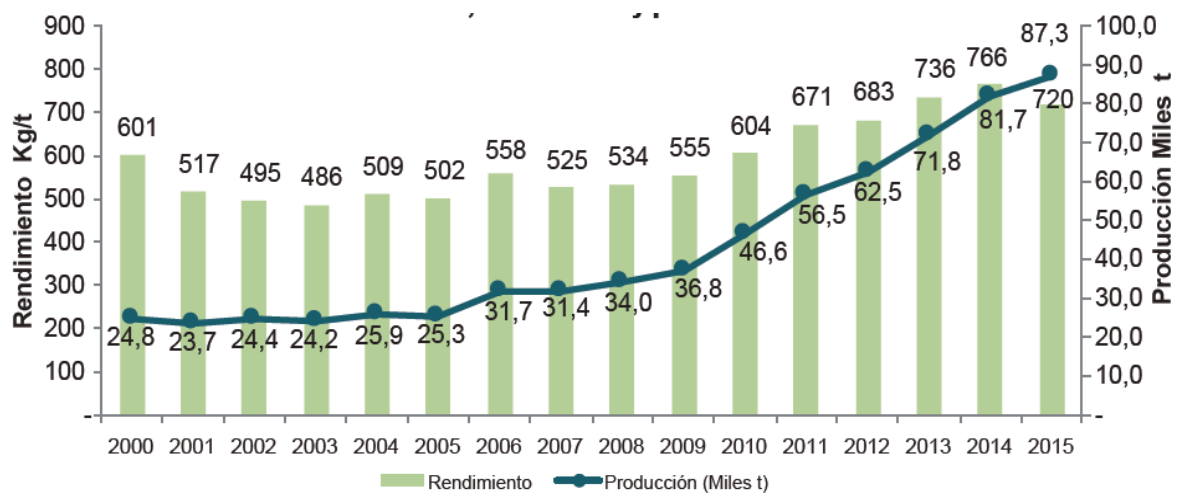


Figura 2: Perú, Producción y rendimiento de cacao

Fuente: MINAGRI (2017)

Morales, *et al.* (2015), también menciona que la región San Martín es desde el año 2012 tiene la mayor superficie cosechada, que concentra el 35.50 % del total nacional, luego Cusco con 22.37 %, Junín 13.01 %, Ayacucho 8.99 % y Amazonas 6.94 %, entre las más importantes. La región San Martín incremento en el año 2013 la superficie cosechada en 19.32 %, Junín con 23.48 %. En cuanto al rendimiento el 2013 fue 736 Kg/Ha, un 7.76 % mayor al registrado el año 2012, en la región San Martín se logró rendimiento de 927 Kg/Ha y Junín 774 Kg/Ha.

## **2.2. POST COSECHA DEL CACAO**

Según Calderón (2002) citado por Camino (2014), la postcosecha del cacao es el proceso de mayor influencia en el desarrollo de calidad fisicoquímica y sensorial, principalmente del sabor y aroma a chocolate. Este proceso involucra dos operaciones: la fermentación y el secado. Loayza (2014), menciona que la post cosecha se inicia con el beneficio de las mazorcas, con el corte de la mazorca, extracción de los granos frescos de cacao, para posteriormente fermentarlos en cajas de madera y luego secarlos sobre parihuelas en piso de concreto, a fin mejorar la calidad. Asimismo Sánchez, Castellanos y Domínguez (2008), afirman que el proceso postcosecha es de gran importancia para la calidad del producto final y concretamente para el desarrollo de sus características organolépticas, las etapas más importantes para el logro del producto final esperado son la fermentación y el secado, ya que promueven las características de color, sabor y aroma del chocolate. Zapata, Tamayo y Alberto (2013), afirman que la fermentación y el secado son pasos críticos en el procesamiento del cacao, causan descomposición de las paredes de las células pigmentarias; sus contenidos quedan expuestos a otros componentes dentro del grano y otorgan otras características físicas y organolépticas, como olor y sabor



### **2.3. FERMENTACION DEL CACAO**

La fermentación está establecida por el origen genético del cacao, calidad de grano cosechado, antigüedad de la plantación, intervalos entre cosechas, cantidad de cacao a fermentar, el método de fermentación y las condiciones climáticas del medio donde se realiza el proceso (Portillo *et al.*, 2006).

El proceso de fermentación es importante para desarrollar la calidad de los granos de cacao, se inicia con la fermentación del mucilago azucarado (fructuosa y glucosa) que envuelven los granos, las fermentaciones son estimuladas por microorganismos que afectan a la pulpa, generando reacciones internas controladas por las enzimas contenidas en los tejidos de los cotiledones, indican (Guillín y Lara, 2010).

Es en este proceso en el cual el cacao obtiene su calidad óptima para hacer chocolate, eliminando la suciedad de las semillas y dando una buena presentación a las almendras. “Durante el proceso, la acción combinada y balanceada de temperatura, alcoholes, ácidos, pH y humedad anulan la actividad del embrión, disminuye el sabor amargo por la pérdida de theobromina y se producen las reacciones bioquímicas que forman el chocolate, (Betancourt y Llano, 2009). Este proceso por lo general no debe llevarse a cabo por más de cuatro días para el cacao criollo y de ocho días para el cacao forastero. Algunos de los métodos más comunes en esta práctica son la fermentación en sacos, en cajas y en montones. Si este proceso se realiza mal o de manera deficiente se produce el llamado cacao corriente (Agraria, 2013).

Prado y Zambrano (2015), afirma que en el proceso de fermentación se presentan dos fases definidas y distintas: la fermentación alcohólica e hidrólisis y la oxidación. Asimismo la

fermentación se da en dos etapas: la primera etapa se realiza en condiciones anaerobias (sin presencia de oxígeno) con producción de alcohol y ácidos, liberando calor y termina en una segunda etapa en condiciones aeróbicas (en presencia de oxígeno).

Asimismo Bravo y Mingo (2011), establecen que en el proceso de fermentación del cacao, se puede identificar dos etapas; la primera que es la descomposición de la pulpa, donde se da el proceso de fermentación tal como desde el punto de vista bioquímico; donde se produce la fermentación de azúcares a alcohol y como producto secundario se genera ácido acético, que dependiendo de las condiciones de fermentación puede ser cuantitativamente igual que el alcohol, no son los únicos productos generados en esta etapa, pero si los más importantes. En la segunda etapa y a partir de las 48 horas por la presencia de  $H_3O^+$  (ion hidronio, cuya concentración define el pH o grado de acidez de una disolución), procedentes fundamentalmente de ácido acético se inicia el proceso en el cual se producen reacciones dentro del cotiledón las cuales no corresponden a este fenómeno.

Teneda (2016), menciona que La fermentación consiste en una serie de cambios físico-químicos que forman el sabor y aroma a chocolate, con:

- Cambios en la pigmentación interna, de color violeta a marrón claro.
- Transformación del sabor astringente de los cotiledones.
- Transformación de los azúcares en alcoholes por las levaduras, los cuales son a su vez convertidos en ácido acético por las bacterias acéticas.

Durante la fermentación existe una relación ordenada entre microorganismos y las variaciones de temperatura, pH y humedad, con la formación de alcoholes, ácidos y compuestos polifenólicos, que inactivan el embrión, disminuyen el sabor amargo y se producen las reacciones bioquímicas que forman el chocolate. Dichas reacciones químicas

en el interior del grano de cacao, dependen de la muerte de las células del cotiledón, con la cual sus membranas celulares se degradan y aumentan su permeabilidad, de esta forma permite la interacción de los diversos componentes celulares. Así los polifenoles, que producen el sabor astringente, pueden difundirse hacia las células adyacentes, donde se encuentran con diversas enzimas que provocan reacciones hidrolíticas por las condiciones anaerobias de la fermentación de los granos de cacao.

Asimismo, Portillo *et al.* (2006), establece que el proceso de fermentación incluye reacciones enzimáticas que contribuyen a la formación de aminoácidos libres y de péptidos, formación de azúcares reductores, hidrólisis de los azúcares y de las antocianinas y la oxidación enzimática de los polifenoles, los cuales son necesarios para producir el sabor y aroma característicos del cacao durante el tostado.

**Tabla 5.**

*Algunos aspectos de los granos de cacao en el proceso de fermentación.*

<b>Tiempo de fermentación</b>		
1° y 2° día	Del 3° al 4° día	Del 5° al 7° día
-Pulpa muy ácida (pH 3,5)	- Masa fermentante está ácida (pH 4,5).	- Masa fermentante está acidulada (pH 5,5).
- Masa fermentante de color blanco.	- Masa fermentante de color café claro.	- Masa fermentante de color café.
- pH 6,5 del interior de la semilla.	- pH 4,5 del interior de la semilla.	- pH 5,5 del interior de la semilla.
- Interior de la semilla color violeta.	-Interior de la semilla color violeta, sus bordes color café.	- Interior de la semilla color café.
- Liger desarrollo de calor.	-Aumento de temperatura de la masa fermentante a 40- 50 °C.	-Temperatura de la masa fermentada se reduce a 35 °C.
- Olor agridulce, aromático.	- Fuerte olor a ácido acético.	- El olor a ácido acético es menos fuerte.

Fuente: Augstburger *et al.*, (2000)

Durante la fermentación y el secado, la enzima oxidasa polifenólica promueve la oxidación Browniana, responsable del color marrón característico del chocolate. El flavor final es influido directamente por el proceso de acidificación de los granos de cacao, por acción del ácido acético producido, de acuerdo al contenido de alcohol formado en la fermentación anaerobia. Igualmente influye el periodo de remoción de la masa de cacao en fermentación. En la tabla 5 se indican algunos aspectos de los granos de cacao en el proceso de fermentación, que inciden en la calidad del cacao fermentado (Portillo B, 2012).

### **2.3.1. Etapas de la fermentación**

#### **a. Fermentación anaerobia**

##### **- Glucólisis, conversión de glucosa a ácido pirúvico**

Según Teneda (2016), la glucólisis es el metabolismo anaerobio de la glucosa contenido en el musilago. Este proceso suministra una fuente de energía rápida para desarrollar la secuencia de reacciones que convierte una molécula de glucosa en dos moléculas de piruvato, con la producción asociada de dos moléculas de ATP. Es un proceso anaerobio, es decir, que no requiere de oxígeno ( $O_2$ ). El piruvato producido en la glucólisis, puede convertirse en lactato mediante la fermentación láctica o en etanol por fermentación alcohólica. En presencia de oxígeno (condiciones aeróbicas) el piruvato puede oxidarse en  $CO_2$  generando una cantidad de energía notable.

La glucólisis consiste de dos fases:

- En la primera fase se transforma la glucosa (C6) en dos moléculas de tres carbonos (C3)
- En la segunda se oxidan las moléculas C3 transformándose en dos moléculas de ácido pirúvico, ATP y  $NADH + H^+$ .

La reacción global es:

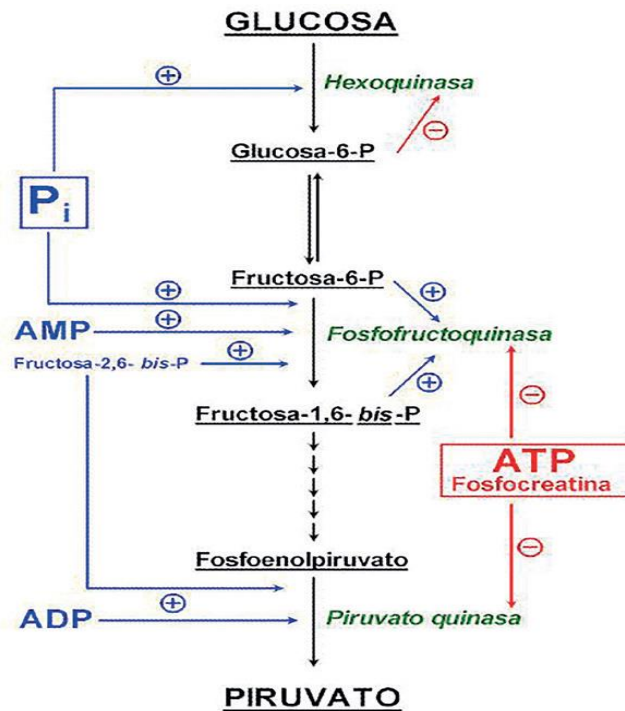
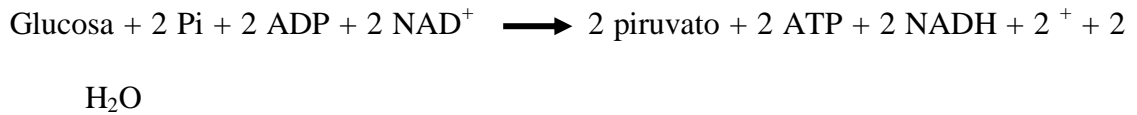


Figura 3: Glucólisis

En este proceso participan 10 enzimas diferentes que catalizan diez reacciones secuenciales, las cuales podríamos dividir en tres etapas: a) formación de fructosa 1,6-bisfosfato a partir de glucosa, b) formación de triosas fosfato (gliceraldehído 3-fosfato y dihidroxiacetona fosfato) a partir de fructosa 1,6-bisfosfato y c) formación de piruvato a partir de gliceraldehído 3-fosfato. Matehews, Holde y Aher (2004).

### - Fermentación Alcohólica

Augstburger (2000) menciona que al principio de este proceso domina la fermentación por alcohol mediante la acción de la levadura, luego predomina la fermentación láctica. Por otra parte Natividad *et al.*, (2007), indican que la fermentación alcohólica

es producida por los géneros *Sacharomyces sp.*, *Bitabacterium sp.*, entre otras. Durante la primera fase de fermentación anaeróbica, los azúcares son transformados en alcohol etílico. La fermentación alcohólica va reduciéndose conforme aumenta la concentración de alcohol alrededor de 10 % y entra oxígeno a la masa conforme se remueve. Asimismo Bravo y Mingo (2011), establecen que por la fermentación del mucilago de cacao se produce el alcohol causada por una sucesión microbiana (levaduras, bacterias de ácido láctico y acetobacter), en esta etapa se produce un aumento importante de temperatura en la reacción produciendo ácido láctico como sub-producto, la pulpa empieza a perder la características fisicoquímicas y permite el ingreso de aire, transformando el proceso a una fermentación aeróbica.

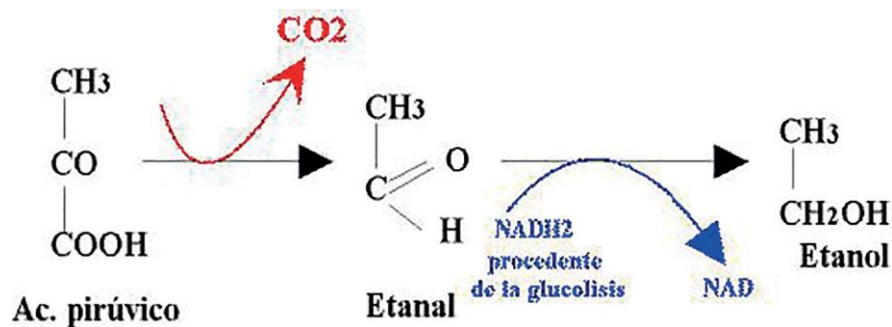


Figura 4: Fermentación Alcohólica

Por su parte Nielsen *et al.* (2008), menciona que la fermentación alcohólica favorece el desarrollo de levaduras en condiciones anaeróbicas, en esta etapa se fermentan los azúcares presentes en la pulpa de los granos, transformándose en alcohol y anhídrido carbónico, degradando la pectina, lo que cambia la textura del grano y elimina el ácido cítrico, generando como consecuencia disminución de la acidez.

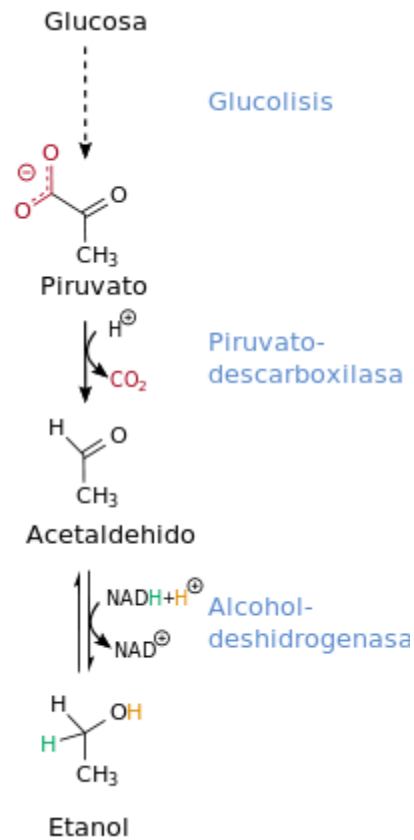


Figura 5: Glucólisis de formación de alcohol

Guillín y Lara (2010), describen como la fase inicial de la fermentación, llevada a cabo por las levaduras, pertenecientes a los géneros: *Saccharomyces*, *Cándida*, *Dedaryomyces*, *Hansenulaa*, *Kloeckera*, *Pichia*, *Rhodotorula*, y *Torulopsis*; además se produce el incremento de microorganismos: *Lactobacillus*, *L. plantarum*, *L. collinoides* y *L. fermentum*, con la producción incorporada de ácido láctico. Asimismo, el conjunto de levaduras consume el oxígeno, creando un ambiente anaerobio que favorece el desarrollo de bacterias lácticas esto ocurre en las primeras 48 horas, (Sánchez P, 2007). Igualmente Navia y Pazmiño (2012), afirman que por acción de las levaduras los azúcares de la pulpa se convierten el alcohol y anhídrido carbónico y otros compuestos menores. Como resultado de la acción de los microorganismos, la temperatura de la masa de semillas aumenta alrededor de 30-35 °C y la célula de la

pulpa comienzan a romperse en las primeras 24 a 36 horas, causando exudación acuosa de la masa. Las levaduras también tienen condiciones para metabolizar el ácido cítrico, principal ácido orgánico de la pulpa provocando un aumento del pH en las 48 horas iniciales de la fermentación.

#### **- Fermentación aerobia (acética)**

En esta etapa de fermentación la masa permite el ingreso de oxígeno mediante la remoción, para favorecer el proceso de oxidación pasando el grupo OH del alcohol a grupo COOH del ácido acético, produciendo un cambio de contenido calórico de -988 KJ/mol, por la acción de la bacterias lácticas y *Acetobacter aceti*, *Lactobacillus*, *L. plantarum*, *L. collinoides* y *L. fermentum*. El ácido acético atraviesa la testa y se difunde hacia el interior de los cotiledones (Bravo y Mingo, 2011). En esta parte de la fermentación, por acción combinada y balanceada de la temperatura, acidez y humedad, ocurre la muerte del embrión, se rompen las estructuras de almacenamiento en el interior de células de los cotiledones; produciéndose la liberación de los polifenoles, antioxidantes y proteínas de reserva, seguida por las reacciones químicas que generan los compuestos precursores del sabor y aroma del cacao y chocolate (Cross, 2000).

Teneda (2016), menciona que en esta fase de fermentación por la remoción que oxigena el ambiente y el descenso del pH, se convierte el etanol obtenido en ácido acético ( $\text{CH}_3\text{COOH}$ ), a través de la oxidación del alcohol, es decir sucederá una fermentación oxidativa. La temperatura ideal del proceso de fermentación acética varía entre 28 a 50 y 30 °C y el pH óptimo es de 4,5. La oxidación del etanol se realiza en dos etapas: en la primera el etanol se oxida a acetaldehído y en la segunda el acetaldehído a ácido acético. Se forman otros productos como acetato de etilo,



butanol, isopropanol, compuestos intermedios de acetaldehído y ácidos orgánicos. La reacción es:  $C_2H_5OH + O_2 \rightarrow CH_3COOH + H_2O$

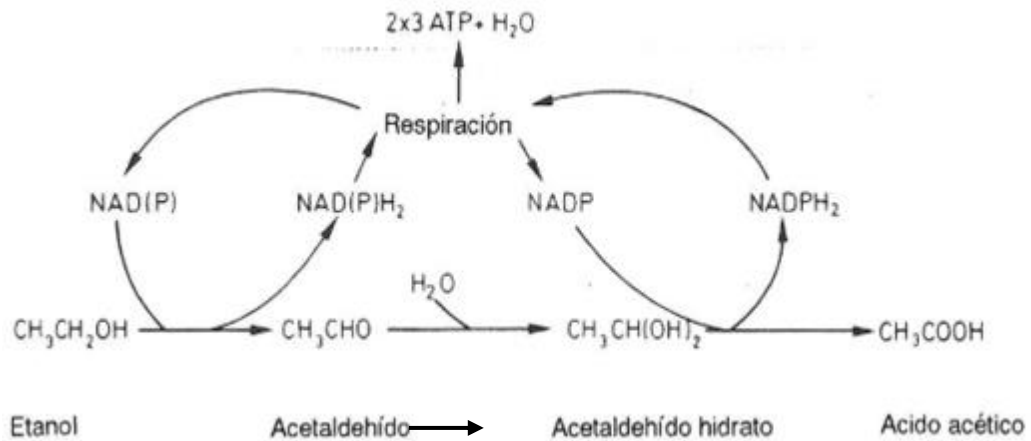


Figura 6: Oxidación de etanol a ácido acético

Durante la etapa de la fermentación acética ocurre un cambio en el producto en proceso, intervienen las bacterias acéticas transformando el etanol producido por las levaduras en ácido acético, que genera aumento de temperatura hasta 50 °C, esta transformación vuelve permeable las paredes celulares del grano, permitiendo la entrada de oxígeno y la interdifusión de los componentes del jugo celular lo que mata al embrión del grano, generando reacciones químicas donde las enzimas se ponen en contacto con las proteínas y polifenoles provocando la disminución del amargor y astringencia; ocurren cambios profundos en los pigmentos purpuras cianidinglucosidos. Este proceso permite el inicio de desarrollo del sabor y aroma del cacao lo cual será de importancia en la calidad del chocolate. (Cleenewerck *et al.*, 2008).

El papel más importante de los microorganismos es el desarrollo de precursores del sabor a chocolate, porque durante la fermentación se desarrollan como metabolitos los aldehídos, cetonas, etc. que forman el sabor completo del chocolate. Asimismo, los microorganismos durante su metabolismo excretan enzimas que hidrolizan el azúcar y pectina del mucilago, permitiendo la eliminación de esta, como también el descenso de la acidez del grano, causada por la presencia del citrato, y sin la producción del ácido acético, el etanol y la temperatura alta, el grano de cacao no presentaría la acción de sus enzimas, (Nielsen *et al.*, 2008)

### **2.3.2. Características tecnológicas de fermentación de cacao**

Los métodos de fermentación varían mucho de una zona de producción a otra, e incluso de un productor a otro; por factores como: el tipo de cacao, el método de fermentación utilizado, conjuntamente con el tiempo de fermentación, la frecuencia de remoción, secado y las condiciones atmosféricas de la zona determinan la calidad del cacao y al mismo tiempo condicionan el precio a pagar por el mismo (Portillo 2006).

Las características tecnológicas de fermentación inciden directamente en la calidad de los granos de cacao, siendo los principales métodos:

#### **a. Cajones de madera a un nivel**

Los cajones son contruidos con tablonos do maderas finas, resistentes a la humedad tales como el Cedro, Nogal y otras do tipo blanco que no desprendan sustancias extrañas que van a interferir en la calidad final del cacao; Estos cajones están provistos do patas que permite separar del suelo 20 cm. Las dimensiones variaran do acuerdo a la producción y volumen do producción. Consiste en llenar las dos terceras partes del cajón con granos en baba do cacao y cubrir con tela para el desarrollo do la

fermentación, esta etapa bien conducida puede permitir lograr granos de buena calidad, (Palacios, 2008).

#### **b. Cajones de madera tipo escalera**

Estos tipos están formados por una o varias series de tres cajones de madera, colocados a diferentes niveles como formando una escalera, esta tecnología permite la facilidad de manipulación durante la fermentación. El cacao fresco recién cosechado se coloca en el cajón superior y a la primera remoción (a las 48 horas) se coloca en el siguiente cajón y luego a igual tiempo en el cajón de abajo, lo que facilitará la remoción de la masa y propiciará la aireación a la misma, (Loayza, 2014).

#### **c. Montón**

La fermentación en montón es una tecnología antigua que se practica en zonas poco capacitadas, que desarrollan granos de cacao de mediana calidad a menor, se hace un tendido de hojas de plátano sobre tablas de madera, donde se amontonan las almendras frescas y se tapan para que se fermenten; las rumas se pueden cubrir con sacos para evitar la fuga de calor que permita la muerte a los embriones, (Arévalo, 2011).

#### **d. Sacos**

Este método consiste en llenar los sacos con cacao en baba y los cuelga para que se escurra y fermente. También se acostumbra a dejar los sacos amontonados en el piso, dejándolo por 5 a 7 días o los días que necesite el tipo de cacao; este método no se recomienda porque ocurre una mala fermentación del grano, originando un alto porcentaje de granos violetas y pizarras, (Palacios, 2008).

#### **e. Fermentación en Tambor Rotatorio**

Se trata de un tambor usado en otros procesos, al que se le han hecho modificaciones como:

1. Sistema de remoción interna, usando un eje con paletas.

2. Sistema de frenado, para la carga y descarga.

Permite fermentar hasta 500 kg de cacao, que es aproximadamente la producción de una hectárea de cacao. El tambor necesita de un lugar cubierto con ventilación, con un piso que tenga canales para recoger y drenar el exudado. Este tipo de fermentador, puede ser cargado y descargado por una sola persona, que puede remover el cacao cada 24 horas sin ayuda, porque las paletas internas hacen todo el trabajo. Permite obtener mejor calidad y rendimiento del grano fermentado, pues se disminuyen los riesgos de contaminación al ser un barril cerrado, que se abre solo para la carga y descarga, (Teneda, 2016).

No hay sabor a chocolate en los granos sin fermentar, durante la fermentación se forman compuestos (precursores del sabor a chocolate) que reaccionarán entre ellos durante el tostado para formar el sabor a chocolate. El sabor a Chocolate depende de dos etapas: tecnología de fermentación que permite formar los precursores del sabor y el tostado donde esos precursores reaccionan, formando el sabor a chocolate (Ríos, 2012)

El tipo de tecnología de fermentación condiciona el desarrollo adecuado de las dos etapas de este proceso: 1. Los azúcares se transforman en alcohol y luego en ácido acético (similar a la fermentación de la uva para producir vino y vinagre). 2. Ácido acético, producido externamente, penetra a través de la cáscara y produce reacciones bioquímicas en el grano que son las responsables de la formación de los precursores del sabor a chocolate (Lambert, 2008).

Según (Rodríguez, 2011), describe la tecnología de fermentación, donde las almendras deben permanecer sin ser removidas, durante las primeras 36 horas, tiempo que dura la

fase de fermentación anaeróbica. Luego, es necesario voltear la masa de cacao diariamente, para permitir la liberación del CO<sub>2</sub> y entrada de oxígeno que garantice el proceso de oxidación. El tiempo de fermentación es de 5 a 6 días, o mejor, de 120 a 144 horas contadas a partir del depósito del grano en los recipientes. Para tener un cacao bien fermentado se debe considerar:

Paso 1: Después de la quiebra de las mazorcas echemos las semillas al fermentador hasta dejarlo repleto.

Paso 2: Tapemos bien el fermentador con hojas de plátano para garantizar que caliente bien las semillas y evitar que le caiga basura.

Paso 3: Esperemos 48 horas para hacer el primer volteo, revolviendo bien el grano con ayuda de un palo.

Paso 4: Después del primer volteo revolvemos las semillas diariamente a la misma hora.

Paso 5: Después de estos 5 o 6 días el grano pasa al secar.

### **2.3.3. Influencia de los parámetros de fermentación en las características sensoriales del cacao**

Se sabe que en el sabor a chocolate participan por lo menos 500 compuestos diferentes y que éste sabor depende de muchos factores, como el tipo de grano de cacao, la época en la cual se cosechó, la fermentación (la acción de microorganismos), la acción de enzimas endógenas (enzimas del cacao), el tostado y el secado. Es por lo mismo muy difícil definir de cuál de todas estas etapas depende la producción de aromas. Las enzimas endógenas, por ejemplo, pueden actuar sobre los carbohidratos, proteínas y polifenoles del grano de cacao, generando aromas. Lo que es un hecho es que el sabor característico del chocolate no se desarrolla si no hay fermentación (Alas y Ríos, 2012).

Tal vez el papel más importante de los microorganismos es el desarrollo de precursores del sabor a chocolate, porque, como hemos señalado, sin la fermentación no se obtiene el sabor completo del chocolate. Pero por otra parte, los microorganismos también son esenciales para preparar el grano, ya que sin ellos no se eliminaría el mucílago, no se eliminaría la acidez del grano, causada por la presencia del citrato. No se conoce con detalle cuáles son los compuestos que determinan el sabor a chocolate; sin embargo, encontraron que existe una correlación entre el aroma de un lote de cacao y el conjunto de microorganismos presentes en la fermentación (Wacher, 2011).

El proceso de fermentación incluye reacciones enzimáticas que contribuyen a la formación de aminoácidos libres y de péptidos, formación de azúcares reductores, hidrólisis de las antocianinas y la oxidación enzimática de los polifenoles, los cuales son necesarios para producir el sabor y aroma característicos del cacao durante el tostado; tanto en la fermentación como en el secado, la enzima oxidasa polifenólica promueve la oxidación Browniana, responsable del color marrón característico del chocolate. El flavor final es, por lo tanto, influido directamente por el proceso de acidificación (Portillo *et al*, 2006). Los granos de cacao están compuestos por células blancas (grasa/manteca, proteínas) y células moradas (polifenoles), Alta temperatura y efecto del ácido, interrumpen la estructura molecular interna, a causa de ésta interrupción los compuestos del grano se mezclan y reaccionan entre ellos; reacciones entre proteínas, enzimas y polifenoles son cruciales para la formación de los precursores del sabor a chocolate, (Alas y Ríos, 2012).

#### **2.3.4. Influencia de los parámetros de fermentación en las características físico-químicas del cacao**

La fermentación del cacao es una etapa muy importante en el procesamiento del grano, ya que se producen cambios bioquímicos que dan origen a los precursores del aroma y sabor (Contreras *et al.*, 2002). Entre los cambios bioquímicos está el desarrollo de la pigmentación color marrón a partir de compuestos fenólicos lo cual es un indicativo de la fermentación del grano de cacao, (Cros y Jeanjean, 1995). Algunos aminoácidos originados en la hidrólisis proteolítica, durante la fermentación, se complementa con sustituyentes fenólicos (quinonas). Esa combinación es la que disminuye el amargor y astringencia (Yoshiyama e Ito, 2002).

Asimismo Suazo (2012), manifiesta que durante la fermentación uno de los cambios físico-químicos que se presenta es lo relacionado a los polifenoles, que se estima que del total de polifenoles en esta semilla, el 60% son flavanoides (monómeros individuales: (+)-catequinas y (-)-epicatequinas; y procianidinas: (+)-catequinas y (-)-epicatequinas condensadas, aunque actualmente estos compuestos son objeto de mucha investigación, existe consenso sobre su efecto antioxidante y, su influencia en varios procesos bioquímicos y fisiológicos del ser humano.

La fermentación y el secado son pasos críticos en el procesamiento del cacao, causan descomposición de las paredes de las células pigmentarias; sus contenidos quedan expuestos a otros componentes dentro del grano y otorgan otras características físicas y organolépticas. En la fermentación aerobia se forman en los granos pigmentos marrones constituidos por polifenoles; la epicatequina y catequina se oxidan a quinonas, y la condensación de las proteínas y polifenoles causan una reducción de la astringencia y

sabor amargo. Los granos frescos de cacao contienen pigmentos antocianínicos morados, como el cianidin-3-D-L-arabinosido y cianidin-3- $\beta$ -Dgalactósido. Durante la fermentación, estos pigmentos son hidrolizados por glicosidasas, que provocan una decoloración de los cotiledones (Niemenak *et al.*, 2006).

### **2.3.5. Influencia de los parámetros de fermentación en el contenido de compuestos bioactivos del cacao**

Aunque en la semilla de cacao se encuentran diversos compuestos, los de interés son aquellos que pertenecen a los flavonoides (ej., catequinas) compuestos que han adquirido notoriedad pública a raíz de su actividad biológica en el hombre, que al consumirlos a través de vegetales o derivados como el chocolate, ejercen funciones anti inflamatorio, antioxidantes y por tanto preventivas ante diversas enfermedades como las del tipo cancerígenas (Schramm *et al.*, 2006).

Se estima que del total de polifenoles en esta semilla, el 60% son flavanoides (monómeros individuales: (+)-catequinas y (-)-epicatequinas; y procianidinas: (+)-catequinas y (-)-epicatequinas condensadas. 37 y, aunque actualmente estos compuestos son objeto de mucha investigación, existe consenso sobre su efecto antioxidante y, su influencia en varios procesos bioquímicos y fisiológicos del ser humano (Visioli y Dávalos, 2011).

Suazo (2012) menciona que la etapa de fermentación es responsable de la pérdida de polifenoles totales, la cual decrece de su estado inicial un 35% (71,42 mg.g<sup>-1</sup>) hasta el tercer día y, un 59% (44,55 mg.g<sup>-1</sup>) hasta el séptimo día de fermentación. Estas pérdidas que se acentúan ligeramente durante el secado, donde las diferencias son marcadas por sistema empleado. Se verificó que las semillas fermentadas por 3 días presentaron pérdidas de



19,1% secadas en estufa (57,19 mg.g<sup>-1</sup>) y 10,8% secadas al sol (62,59 mg.g<sup>-1</sup>) y que las semillas fermentadas por 7 días presentan pérdidas de 11,6% secados en estufa (38,47 mg.g<sup>-1</sup>) y un 2,8% secado al sol (43,10 mg.g<sup>-1</sup>)

Los polifenoles de estas semillas son relacionados con la actividad antioxidante, se cree que cuanto más elevado sea la cuantificación de polifenoles mayor es la actividad antioxidante. Sin embargo, con el fermentado se pierde gran parte de los polifenoles de esta semilla, básicamente porque este proceso busca generar los precursores del sabor y el color característicos de los derivados como el chocolate (Efraim *et al.*, 2010).

Las concentraciones de antioxidantes que se encuentran en la semilla de cacao - flavanóides [(monómeros individuales: (+)-catequinas y (-)-epicatequinas) y procianidinas ((+)-catequinas y (-)-epicatequinas condensadas)] dependen de varios factores, pero principalmente de los procesos pos cosecha a la que es sometida la semilla durante la elaboración de derivados, no obstante, estos derivados conservan importantes concentraciones de compuestos con poder antioxidantes, importante en la salud humana (Vriens, 2010).

El contenido de polifenoles totales de las almendras de cacao disminuyen en función del tiempo de fermentación, obteniéndose valores entre 142,45 y 45,48 mgAG/g, la concentración de los flavonoles disminuye durante la fermentación indistintamente del factor estudiado; ocurre una fuerte disminución del contenido de fenoles totales entre el 70 y 80%. Esta disminución se debe a fenómenos de difusión, de curtido y de polimerización oxidativa que ocasiona una reducción de la astringencia (Portillo B., 2012). Los polifenoles de la semilla del cacao están almacenados en células distribuidas en grupos a través de los

cotiledones. Son compuestos que participan activamente en las modificaciones bioquímicas en el interior de las almendras durante la fermentación, una de ellas, la oxidación enzimática, que causa la disminución del contenido de polifenoles (Calderón, 2002).

## 2.4. MICROORGANISMOS DE FERMENTACION DE CACAO

Según Wachter (2011), el proceso de fermentación del cacao es natural o espontáneo, ya que no se añaden intencionalmente los microorganismos a los granos, que se encuentran estériles dentro de las vainas. Se contaminan con microorganismos provenientes de todas las superficies con las que entran en contacto durante el beneficio, el medio ambiente, de acuerdo a las características que posee el cacao en baba, como se muestra en figura 6.

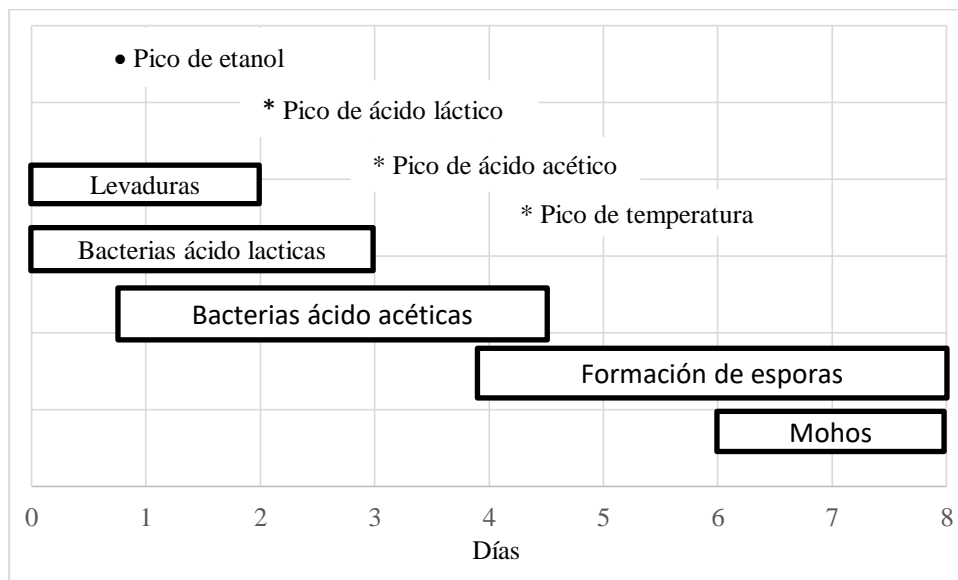


Figura 7: Esquema de sucesión microbiana durante la fermentación de cacao

Fuente: adaptado de Schwan y Wheals, (2004).

Nielsen *et al* (2007), mencionan que en la primera fase aparecen entre 5 y 6 especies diferentes de levaduras, como: *Cándida silvae*, *Cándida zemplinina* y *Cándida diversa*, principalmente los *Saccharomyces cerevisiae*, son levaduras que se encuentran

frecuentemente en las fermentaciones en cajones; luego la mayoría desaparecen, apareciendo la especie *Hanseniaspora guilliermondii*, que es la levadura predominante junto a *Saccharomyces cerevisiae*, durante las primeras 24 horas. Se reporta que luego de las 24 horas dominan *Saccharomyces cerevisiae* y *Pichia membranaefaciens*, que se encuentra al final de la fermentación. En la fermentación del cacao participan un gran número de especies de microorganismos, dependiendo del medio donde se desarrolla la fermentación. Teneda (2016), afirma que, en la fase inicial consiste en una fermentación alcohólica llevada a cabo por las levaduras, pertenecientes a los géneros *Saccharomyces spp.*, *Candida*, *Dedaryomyces*, *Hansenulaa*, *Kloeckera*, *Pichia*, *Rhodotorula*, y *Torulopsis*. Las especies encontradas con mayor frecuencia son *S. cerevisiae*, *Candida krusei*, *Kloeckera apiculata*, *Pichia fermentans* y *Hansenula anomala*

En la segunda fase del proceso de fermentación del cacao, se desarrollan las bacterias lácticas, que fermentan los carbohidratos residuales y continúan el consumo del ácido cítrico. En las fermentaciones se han aislado sobre todo bacterias del tipo *Lactobacilos (Lb. fermentum, Lb. mali y Lb. plantarum)*, aunque también se han identificado bacterias como *Leuconostoc pseudomesenteroides*, *Leuconostoc pseudoficulneum*, y *Pediococcus acidilactici*. Las levaduras producen por metabolismo enzimas pectinolíticas que hidrolizan las pectinas, ocasionando una disminución de la viscosidad del mucílago y favoreciendo la entrada de aire. Con éste ambiente aerobio y menos ácido - debido al consumo de ácido cítrico- se favorece el desarrollo de bacterias acéticas, (Nielsen *et al* 2007). A 50°C las levaduras dejan de crecer y son sustituidas por bacterias acéticas de los géneros *Acetobacter* y *Gluconobacter*, que aprovechan la aireación y el etanol para producir ácido acético. (Teneda 2016).

En la tercera fase de la fermentación ocurre un cambio importante en términos de los productos de la fermentación, ya que intervienen bacterias acéticas que llevan a cabo la transformación del etanol en ácido acético. Las más importantes bacterias acéticas que se han aislado de la fermentación del cacao, son: *Acetobacter aceti* y *Gluconobacter oxydans*, (Nielsen *et al* 2007).

#### **2.4.1. Levaduras**

Las levaduras se encuentran ampliamente distribuidas en la naturaleza, jugando un papel importante en la dinámica biológica y química de los suelos, plantas, animales y agua donde son activas competidoras de nutrientes, actúan como antagonistas y en asociaciones simbióticas. Producen ácidos grasos que inhiben el crecimiento de las bacterias Gram negativas y otras veces actúan como cooperadores suministrando nutrientes o sustratos degradados a otros microorganismos, (Sarmiento y Herrera, 2003).

Las levaduras son hongos unicelulares, con una morfología característica esférica u ovalada. Las levaduras se hallan ampliamente distribuidas en la naturaleza y se encuentran frecuentemente en forma de polvillo blanco que cubre los frutos y las hojas. La mayoría de las levaduras se reproducen asexualmente por gemación multicelular o por gemación polar, mecanismo de reproducción mediante el cual una porción de protoplasma sobresale de la pared de la célula de la levadura y forma una protuberancia; esta protuberancia, o yema, aumenta de tamaño y finalmente se desprende como célula de levadura neoformada (Petrenko, 2004).

El aprovechamiento de los azúcares por las células es el primer paso en el catabolismo de las levaduras; este proceso es catalizado por transportadores específicos. En general,

concurren dos tipos de sistemas de transporte, llamados difusión facilitada y transporte activo. El mecanismo común para el metabolismo de carbohidratos por parte de los microorganismos es la conversión de glucosa-6-fosfato a piruvato por la vía Embden-MeyerhoffParnass. En las levaduras, esta vía glicolítica es la ruta principal para el catabolismo de azúcares por la acción de enzimas requeridas para su división y transformación. Después de la fosforilación por hexoquinasas de los azúcares libres externos o de oligosacaridos, ocurren una serie de reacciones que convierte la glucosa-6-fosfato en piruvato. En condiciones anaeróbicas, el piruvato es fermentado para formar etanol y dióxido de carbono (Déak y Beuchat, 2008)

Teneda (2016), establece que durante la fermentación del cacao, el mucílago posee los nutrientes requeridos para el desarrollo de actividad de las levaduras, como altas concentraciones de azúcares, elementos minerales y sustancias nitrogenadas. La gran mayoría de las levaduras son mesófilas, con una temperatura máxima de crecimiento entre 24 y 48 °C. Solo unas pocas (2 %) son psicrófilas con una temperatura máxima de crecimiento por debajo de 24 °C. No hay levaduras que puedan crecer a 50 °C. La mayoría de las levaduras toleran un rango de pH entre 3 y 10, pero prefieren un medio ligeramente ácido con un pH de 4,5 a 6,5.

### **2.3.1. Género *Saccharomyces cerevisiae*.**

Estas levaduras pertenecen a la división Ascomycotina. Las células de estas levaduras pueden ser redondeadas, ovaladas o alargadas y pueden producir pseudohifas. Se reproducen por gemación multipolar mediante la producción de ascosporas. Las ascosporas, en número de una a cuatro por asca, suelen ser redondeadas u ovaladas. La especie *S.cerevisiae*, se emplea cepas de levaduras y de su rendimiento celular, en muchas

industrias alimentarias, utilizándose cepas específicas en las fermentación del pan, en la fermentación de la cerveza inglesa, en la fermentación de los vinos, biomasas y en la producción de alcohol, glicerol e invertasa, (Petrenko, 2004).

Los microorganismos de fermentación del cacao varían dependiendo de la finca productora, lo que deriva en diferencias de sabor y calidad; algunos microorganismos no son deseables, ya que penetran en los granos y otorgan un mal sabor al chocolate, otros no consumen la pulpa en su totalidad, por lo que se puede obtener granos de cacao fermentados de calidades no esperados. Se caracterizaron más de 1.000 cepas de *Saccharomyces cerevisiae* (levadura de: cerveza, vino y pan), también caracterizaron algunas cepas de microorganismos que intervienen en el proceso de fermentación del cacao. Se generó híbridos cruzando algunas cepas de *Sacharomyces cereviseae*, así obtuvieron las cepas híbridas, se utilizó en la fermentación del cacao logrando granos fermentados de calidad superior, (Meersman, *et al*, 2015).

Por los avances en genómica funcional y biología sistemática, *S. cerevisiae* es considerada un organismo modelo para el estudio de la biología eucariótica y de enfermedades humanas. Además, se ha comprobado el rol de estas levaduras en la fermentación del cacao; de hecho, dada la importancia de la fermentación en las características organolépticas del chocolate, sus sabores y aromas han sido sujeto de numerosos estudios. Una fermentación de cacao sin *Saccharomyces cereviseae*, daría un producto ajeno al chocolate, (Schwan y Wheals, 2004).

## 2.4.2. Bacterias

### - *Lactobacillus fermentum*

Es una especie de bacterias gram-positivas del género lactobacilos. Es miembro generalizada del género *Lactobacillus*, comúnmente se encuentran en muchos alimentos fermentados, así como materia de la planta anaeróbica. Toleran bien concentraciones relativamente altas de ácidos y valores de pH más bajos que el resto de las bacterias por lo que pueden desplazarlas de los hábitats que colonizan. Bacterias muy importantes en la producción de alimentos fermentados y en el deterioro por fermentación de alimentos, (Ramírez *et al*, 2013).

Las cepas específicas del cacao son las *Lactobacillus fermentum* ya que están mejores adaptadas al ecosistema de la pulpa de cacao, ellas fermentan glucosa a ácido láctico y ácido acético, reducen fructosa a manitol, y convierten ácido cítrico en ácido láctico y 2,3-butanodiol. Se demostró en un estudio que la pulpa de cacao en realidad es un substrato ideal para especies estrictamente heterofermentativas (*Lactobacillus fermentum*), porque contiene una alta concentración de fructosa (fuente de energía y/o alternativa externa de aceptor de electrones) y ácido cítrico (fuente adicional del piruvato) (Lefeber, Janssens, Moens, Gobert, & De Vuyst, 2011).

Las especies de bacterias ácido lácticas son importantes para el éxito de una sucesión microbiana durante las fermentaciones de granos de cacao; en realidad, las BAL forman el enlace entre el etanol producido por la fermentación de las levaduras y el ácido acético producido por la fermentación del BAA (Lefeber, Janssens, Moens, Gobert, & De Vuyst, 2011).

### - Bacterias ácido acéticas

Durante la segunda etapa de fermentación del cacao predominan las bacterias acetobacterias o bacterias acéticas (BA) que son un grupo de microorganismos Gram (-), que miden entre 0,4 y 4,5  $\mu\text{m}$  de largo y entre 0,4-1  $\mu\text{m}$  de ancho, con forma elipsoidal, que pueden presentarse de manera individual, en parejas o en cadenas. A veces presentan flagelos y no pueden formar endosporas como estructura de supervivencia. Este grupo de microorganismos necesita del oxígeno como aceptor final de electrones, por lo que tienen un metabolismo aerobio obligado. Es el caso de fermentación de cacao utilizan el etanol como fuente de carbono. El pH óptimo de crecimiento está entre 5 y 6,5, aunque algunas especies pueden llegar a crecer a pH cercanos a 3. Son parte de este grupo los géneros *Acetobacter aceti*, *Acetobacter pasteurianus*, *Gluconobacter*, *Gluconacetobacter*, *Acidomonas*, etc. (Teneda, 2016).

BAA contribuye al desarrollo del cacao de alta calidad ya que juegan un papel crítico en la fermentación espontánea de los granos de cacao, considerado como el primer paso en la producción de chocolate (Schwan & Wheals, 2004), citado por (Cleenwerck, y otros, 2007).

Las bacterias acéticas más importantes que se han aislado de la fermentación del cacao son: *Gluconobacter oxydans*, *Acetobacter aceti* y *Acetobacter pasteurianus* (Nielsen, et al., 2007), citado por (Wacher, 2011). En las fermentaciones tradicionales del cacao ecuatoriano (montones y cajas), se han aislado bacterias ácido acéticas y cuyo principal representante fue *Acetobacter pasteurianus* que generalmente aparecieron después de la fermentación y oxida etanol en ácido acético, en las fermentaciones naturales se encontraron densidades de población de las BAA de  $8,0 \pm 0,5 \log \text{ UFC g}^{-1}$



(Papalexandratou, y otros, 2011). Se sabe que la bacteria *Acetobacter pasteurianus*, cambia fisiológicamente a la fermentación en masa de cacao, pero los investigadores no están seguros de cómo se hace esto. Las bacterias del ácido acético son uno de los últimos organismos que aparecen en el proceso de fermentación, e influyen en los sabores y color en gran medida mediante la oxidación de muchos compuestos fabricados por otros organismos, (James, 2016)

**- *Gluconobácter oxydans***

*Oxydans Gluconobácter*, anteriormente conocido como *suboxydans acetobacter*, son Gram-negativas varilla o bacterias en forma de óvalo que van desde aproximadamente 0,5 a 0,8 mm x 4,2 mm. es una bacteria gramnegativa que pertenece a la familia *Acetobacteraceae*. *G. oxydans* es un aerobio obligado, que tiene un tipo de metabolismo respiratorio utilizando oxígeno como aceptor terminal de electrones; se desarrollan en sustratos dulces, (Prust, *et al* 2005).

La bacteria *Gluconobacter oxydans*, anteriormente se conocía por el nombre *Acetobacter oxydans*, se caracteriza por la capacidad de oxidación de la glucosa a gluconato y presenta una pequeña dificultad para la oxidación de etanol a acetato. Los géneros *Gluconobacter* y *Acetobacter* se encuentran relacionados entre sí y son clasificados como bacterias productoras de ácido acético. Lo que diferencia una de la otra es la oxidación de glucosa a etano, (Da Silva *et al*, 2009). La bacteria *Gluconobacter oxydans* produce por lo general oxidación incompleta de azúcares, alcoholes y ácidos, incluso en presencia de una gran cantidad de oxígeno. Cerca del 85% de las cepas *Gluconobacter* son capaces de formar ácido a partir de n-propanol, nbutanol, glicerol, m-eritritol, D-manitol, D-arabinosa, Dribose, D-fructosa, D-manosa y la maltosa. Anteriormente, se han hecho

estudios cinéticos y de optimización para la producción de DHA a partir de glicerol 29 utilizando *G. Oxydans*, por la aplicabilidad que presenta la dihidroxiacetona en las industrias química y farmacéutica, (Hekmat y Bauer, 2007)

#### **2.4. ENZIMA PECTOLITICA**

Las enzimas pectinolíticas se encuentran de manera natural en frutas y vegetales como el caso del cacao, pero también son producidas por microorganismos. Entre ellos se encuentran diferentes géneros de bacterias, levaduras y hongos filamentosos (Wollgast *et al.*, 2000). Las pectinasas son enzimas que se usan en la industria de vegetales, vinos, frutas y en la producción de jugos para la clarificación, disminución de la viscosidad y aumento en los rendimientos de proceso. Las pectinasas comprenden la poligalacturonasa, pectinestearasa, pectinialiasa y pectatoliasa, que catalizan la degradación del polímero de sustancias pécticas en diferentes tipos de enlaces. La poligalacturonasa presenta una actividad pectolítica máxima a pH de 4.5 y temperatura de 50 °C. (Puerta, 2009)

Enzimas pectinasas degradan las cadenas homogalacturónicas de las pectinas. Estas enzimas degradan la cadena principal de las pectinas y constituye el grupo de pectinasas más antiguo y mejor conocido. La endo-poligalacturonasa y la exopoligalacturonasa catalizan la hidrólisis de los enlaces entre ácidos galacturónicos no metilados y unidos en  $\alpha$  (1→4). Su actividad es posible gracias a la acción previa de la pectina-metilesterasa que libera el metanol unido por enlace éster a las funciones carboxílicas de los ácidos de las pectinas naturales de la uva y otros frutos de esta naturaleza (Andrade, 2009). Tanto la actividad enzimática como los mecanismos que controlan su síntesis y su secreción en la fermentación del cacao, están bajo la influencia de diversos factores ambientales, tales como el pH del mucilago, la temperatura de fermentación, la naturaleza y tipo de

fermentación y cantidad de la fuente de carbono presente en el mucilago de cacao, (Beltran *et al.*, 2011). Asimismo, la hidrólisis enzimática de las sustancias pécticas presentes en el mucilago, también depende de varios factores fisicoquímicos, como: del tiempo de contacto, concentración de enzima, temperatura de fermentación y pH del mucilago (Nadaroglu *et al.*, 2010).

## **2.5. COMPUESTOS BIOACTIVOS**

### **2.5.1. Antioxidantes**

Un antioxidante es una molécula capaz de retardar o prevenir la oxidación de otras moléculas. La oxidación es una reacción química de transferencia de electrones de una molécula que pierde un electrón y por lo tanto se oxida a otra que gana el electrón y por lo tanto se reduce. Las reacciones de oxidación pueden producir radicales libres que comienzan reacciones en cadena que dañan las células. Los radicales se producen durante la respiración con la presencia de oxígeno que aunque es imprescindible para la vida celular de nuestro organismo, también induce la formación de éstas moléculas reactivas, que provocan a lo largo de la vida efectos negativos para la salud debido a su capacidad de alterar el ADN (los genes), las proteínas y los lípidos o grasas "oxidación" (Dreosti, 2000)

Los antioxidantes terminan estas reacciones quitando intermedios del radical libre e inhiben otras reacciones de oxidación oxidándose ellos mismos. Debido a esto es que los antioxidantes como los polifenoles son a menudo agentes reductores y ejercen funciones preventivas (neuroprotectoras) contra enfermedades tan importantes como las coronarias y otras igualmente temidas como el hombre como el Alzheimer y Parkinson, que se caracterizan particularmente por la disminución de la funcionalidad de células cerebrales (Lin, 2011). Las antocianinas y otras sustancias polifenólicas de las células pigmentadas,

pueden difundirse entonces hacia las células adyacentes de almacenamiento, donde se encuentran con diversas enzimas que provocan reacciones hidrolíticas en las condiciones anaerobias del grano de cacao, (Alas y Ríos, 2012). Durante la fermentación de los granos de cacao, las antocianinas son hidrolizadas por acción de las glicosidasas, que causan el blanqueamiento de los cotiledones. Estas enzimas hidrolizan el enlace glicosídico de las antocianinas y producen azúcar y aglicona, que reduce así el contenido de antocianinas, (Zapata et al, 2013).

Las concentraciones de antioxidantes que se encuentran en la semilla de cacao - flavanóides [(monómeros individuales: (+)-catequinas y (-)-epicatequinas) y procianidinas ((+)-catequinas y (-)-epicatequinas condensadas)] dependen de varios factores, pero principalmente de los procesos pos cosecha a la que es sometida la semilla durante la elaboración de derivados. Esto es debido a que los procesos pos cosecha tienen como principal objetivo el perfil organoléptico de los derivados como el chocolate, no obstante, este derivado conserva importantes concentraciones de compuestos con poder antioxidantes, importante en la salud humana, (Vriens, 2012)

### **2.5.2. Polifenoles**

El creciente interés sobre los polifenoles ha incentivado el estudio de su concentración natural en plantas y frutos y los factores que le impactan, debido en parte a sus propiedades funcionales como antioxidantes. En la semilla de cacao los polifenoles se encuentran en la cascara y en el cotiledón, el cual se caracteriza por el color violeta intenso, color relacionado con polifenoles específicos como las catequinas y antocianinas (Cakirer *et al.*, 2003).

Los polifenoles en la semilla de cacao constituyen aproximadamente entre el 10% y el 12% del peso seco de la semilla. Aunque en la semilla de cacao se encuentran diversos compuestos, los de interés son aquellos que pertenecen a los flavonoides, como las catequinas que han adquirido importancia por su actividad biológica en el hombre, que al consumirlos a través de vegetales o derivados como el chocolate, ejercen funciones anti inflamatorio, antioxidantes y por tanto preventivas ante diversas enfermedades como las del tipo cancerígenas (Rusconi *et al*, 2010).

De acuerdo a Palacios (2008), los polifenoles están implicados en las modificaciones bioquímicas internas de los cotiledones durante la fermentación, normalmente el descenso del conjunto de estos compuestos (fenoles totales, taninos y antocianinas) ocurre por la oxidación enzimática. Específicamente la disminución del contenido de polifenoles se explica por la hidrólisis de las antocianinas y a la vez por la polimerización de los monómeros y oligómeros de flavonoles en los compuestos insolubles; lo cual disminuye la astringencia del cacao y el sabor amargo asociado a los taninos.

El cacao es en particular rico en polifenoles, estos representan entre 12 y 18 % del peso seco de los granos, y se encuentran fuertemente asociados con la actividad antioxidante y con las características organolépticas de los productos elaborados a partir del cacao, (Jonfia *et al*, 2008; Wollgast y Anklam, 2000). Los polifenoles en los granos de cacao son almacenados en las células pigmentarias de los cotiledones, y le aportan colores que van desde el blanco hasta un morado oscuro, dependiendo de la cantidad de antocianinas almacenadas (Osman *et al*, 2004). En los frutos de cacao se pueden distinguir 3 tipos de polifenoles: catequinas o flavan-3-oles (37 %), antocianinas (4 %) y proantocianidinas (58 %). La principal catequina es (-)-epicatequina con un máximo de hasta 35 % del contenido

de polifenoles. También se han encontrado en cantidades menores (+)-catequina, (+)-galocatequina y (-) epigallocatequina, (Ortega *et al.*, 2008)

## 2.6. CALIDAD DEL CACAO

Gutiérrez (2007), menciona que la calidad final de un grano de cacao depende de los siguientes factores:

- 50% genética del cacao. Si no es utilizada una planta fina no se podrá nunca producir un chocolate de degustación.
- 20% post-cosecha, es decir, fermentación y secado apropiado.
- 25% transformación (tostado y conchado).
- 5% suelo y estación.

### 2.6.1. Calidad según grado de fermentación

La clasificación de calidad de los granos de cacao se dan en dos categorías tal como se según muestra el cuadro 6 y 7. Dentro de estos no se consideran defectuosos los granos germinados y planos.

**Tabla 6:**

*Clasificación de granos fermentados para producción interna del país*

Grado	Porcentaje de granos		
	Mohosos	Pizarrosos	Dañados por insectos, germinados o planos
1	3	3	3
2	4	8	6

Fuente: Norma técnica peruana – ISO 2451. INACAL (2016).

**Tabla 7:**

*Clasificación de granos no fermentados para producción interna*

Grado	Porcentaje de granos		
	Mohosos	Pizarrosos	Dañados por insectos, germinados o planos
1	3	$\geq 20$	3
2	4	$\geq 20$	6

Los porcentajes son los máximos permitidos excepto para los granos pizarrosos, donde el porcentaje es mínimo. Los porcentajes indicados en la última columna se aplican a todos los defectos ahí mencionados tomados en conjunto.

Fuente: Norma técnica peruana – ISO 2451. INACAL (2016).

El análisis más empleado evaluar la calidad de grano seco es la prueba de corte. Es recomendable realizarla máximo hasta los 30 días después de terminado el proceso de secado, para evitar el riesgo de la oxidación del grano, que se expresa en granos de color café o marrón, y que confundan los granos sobre fermentados con los granos bien fermentados (Alcocer *et al.*, 2015).

La prueba de corte es un instrumento subjetivo de evaluación que sirve para conocer el estado de la fermentación de las almendras, además de otras características físicas y sanitarias (tamaño, peso, porcentaje de humedad, contenido de material extraño, mohos, hongos e insectos) vinculadas con la calidad. Sin embargo, la prueba como tal no es suficiente para determinar con precisión la calidad final de un lote de cacao. Los resultados de la prueba de corte permiten la clasificación de las almendras por categorías, (Ramos 2004). Las categorías para clasificar el cacao en la prueba de corte son según el tabla 8.

**Tabla 8:**

*Categoría para clasificación de granos en la prueba de corte.*

Categoría	Descripción
Bien fermentados	Semilla hinchada y gruesa, la cáscara es fácil de separar, naturaleza quebradiza, forma arrañonada, color café claro a oscuro o blanquecino, sabor ligeramente amargo y ligeramente ácido, calidad de sabor/aroma superior y muy deseable para la producción de chocolate.
Semi-fermentados	Granos de color marrón y violeta, hinchados con pequeña cavidad interior, fermentación parcial, los ácidos no han penetrado totalmente y una porción de las vacuolas de pigmentación están intactas, calidad de sabor y aroma regular, pero aprovechable para producir chocolate.
Violetas	Forma aplanada, la cáscara es difícil de separar, color violáceo en su interior, naturaleza compacta, sabor amargo, ácido y astringente, no se puede aprovechar para la industria chocolatera.
Pizarrosos	Semilla seca o aplanada, la cáscara es difícil de separar, color gris en el interior, naturaleza compacta, sabor amargo y muy astringente, sin sabores típicos a cacao.
Con Moho	Presencia de moho dentro de los cotiledones, lo cual destruye el sabor del grano. Secado y almacenamiento no adecuado (más de 85% de humedad relativa al ambiente).
Infestados	Granos con insectos dentro del cotiledón, excrementos harinosos que depositan algunas larvas en la superficie de la semilla.
Germinados	Proviene de mazorcas posiblemente sobre maduras, los hongos e insectos aprovechan los agujeros del grano para penetrar en ellas.
Aplanados	Granos casi sin cotiledones, provenientes de mazorcas inmaduras. Granos inútiles para la producción de chocolate.

Fuente: Alcocer y Sandy (2015); Schilling y Regalado (2009).

#### **a. Principales defectos en granos**

Principales defectos físicos de los granos de cacao seco (INDECOPI, 2011).

**Grano mohoso:** Grano de cacao en cuya parte interna el hongo es visible a simple vista.



**Grano pizarroso:** Grano de cacao que muestra un color pizarroso (grisáceo) en la mitad o más de la superficie expuesta en la prueba de corte.

**Grano violáceo:** Grano de cacao insuficientemente fermentado, el mismo que cuando se hace un corte longitudinal a través de su centro, presenta un color violáceo por lo menos en la mitad de la superficie.

**Grano dañado por insecto:** Grano de cacao que en la parte interna contiene insectos en cualquier estado de desarrollo, o que ha sido atacado por insectos que han causado en el daño visible a simple vista.

**Grano germinado:** Grano de cacao que en la cascarilla ha sido agujereada, abierta o rota por la germinación de la semilla.

**Grano pasilla:** Grano de cacao que en los dos cotiledones son tan delgados que no es posible obtener una superficie de cotiledón por corte.

**Grano múltiple:** Dos o más granos unidos íntimamente por una de sus caras con restos de mucilago.

**Grano partido:** Grano de cacao que ha perdido un fragmento, y en el que la parte pérdida equivale a menos de la mitad del grano.

### **2.6.2. Características sensoriales del cacao**

La evaluación sensorial de licores de cacao permite realizar conclusiones sobre el nivel de fermentación y la calidad organoléptica del producto obtenido, de acuerdo a los resultados existe transparencia en la fase de comercialización del cacao en grano a nivel nacional e internacional ofreciendo referencias para la toma de decisiones, por lo que es importante realizar a más de la calificación física el análisis sensoriales para determinar las características organolépticas de dicho producto (Calderón, 2002)

Graziani *et al.*, (2003), expresa un punto dominante en la calificación del cacao de exportación se basa en la características organoléptica (sabor y aroma), tales como el amargor y la astringencia, que están intrínsecas en las almendras de cacao, requisito fundamental para la elaboración de chocolates finos. El cacao debe desarrollar el aroma y el característico sabor “arriba”, para que sea calificado como de primera calidad. Estas cualidades se desarrollan solamente cuando las almendras, debidamente fermentadas y secadas son tostadas.

Jiménez (2003), menciona que las cualidades organolépticas que deben reunir los granos de cacao que son deseados por los fabricantes para procesar un producto de buena calidad, siendo estas las siguientes: 1) capacidad para desarrollar un buen chocolate, aroma (a cacao), y 2) libres de sabores secundarios especialmente humo, moho y acidez excesiva. Los fabricantes de chocolate, en los cacaos finos, tratan de encontrar delicados matices de sabor y en los básicos se preocupan más de que no tengan sabores extraños. Además, describe que los peores defectos que se pueden encontrar en los licores de cacao son el sabor a humo, ocasionado por el secado artificial del cacao y el olor a jamón ahumado ocasionado por una sobre fermentación.

La evaluación sensorial significa degustar el licor de cacao para buscar sus virtudes y sus defectos, analizándolo y descubriéndolo. En definitiva, es un arte para el que no todo el mundo está calificado ya que se precisa de un buen paladar, un buen olfato y un buen tacto para captar las cualidades del cacao (Gutiérrez, 2009). La calidad de grano de cacao se clasifica en dos categorías: Cacao corriente o “Bulk” y cacao fino de aroma o “Flavor”. En el mundo se producen aproximadamente 4 millones de toneladas de cacao por año, de las cuales sólo el 5% es catalogado como cacao fino (Afoakwa, Paterson, Fowler & Ryan,

2008), siendo América Latina y el Caribe la región que aporta el 80% de este tipo de cacao. La Organización Internacional de Cacao y Chocolate (ICCO) ha calificado al cacao Peruano como fino y de aroma, debido a que proviene de variedades cuya base genética han sido cacao tipo Criollo y Trinitario, (UNCTAD, 2014).

Los microorganismos presentes durante la fermentación del cacao son responsables de la producción de metabolitos y precursores del aroma que afectan la calidad de la cual resulta el chocolate. (Batista *et al.*, 2015),.El sabor es uno de los más importantes criterios de calidad para los fabricantes de chocolate (Argout *et al.*, 2008). En el cacao se han identificado los sabores básicos dulce, amargo, ácido y la sensación astringente (Fisher y Scott, 2000).

Tabla 9: Sabores presentes en la evaluación sensorial del licor de cacao

Sabores	Descripción	Referencia
Sabores básicos		
Dulce	Se asocia con el azúcar, edulcorantes sintéticos, los aminoácidos entre otros que le dan esta particularidad.	Azúcar
Salado	Provocado por la presencia de sales inorgánicas de bajo peso molecular. Como la sal común.	Sal común.
Ácido	Se debe a la presencia de ácidos volátiles y no volátiles, que se percibe a ambos lados de la lengua. Hay ácidos agradables (cítricos), e indeseables como el acético (vinagre), láctico (agrios, vómito).	Frutas cítricas, vinagre, yogurt
Amargo	Relacionado con cafeína, quinina, debido a la falta de fermentación, se percibe en la lengua y garganta.	Café, cerveza.
Sabores específicos		
A cacao	Describe una sensación típica a granos de cacao bien fermentados, tostados y libres de defectos. Asociar con sabor amargo residual del café negro.	Chocolate, cacao fermentado.
Afrutado	Sabor y olor de frutas maduras, generalmente describe una nota de aroma dulce y acidez agradables.	Todo tipo de frutas
Floral	Caracteriza licores con un olor a flores, casi perfumado, brinda una sensación de frescura, combinación entre notas herbales, medicinales y el sabor llega a ser amargo.	Jazmín, agua de azahar.
A nueces	Sensación dulce agradable, que evoca el olor maní, almendras o cualquier tipo de nueces como un fondo que persiste. Su percepción inicialmente se encuentra en el aroma del licor y al saborear después de un tiempo.	Frutos secos
A panela	Inicialmente se puede detectar un aroma a caña, molienda de trapiche. Luego un sabor a panela, la mayoría de las veces acompañado del sabor amarguito suave y dulzón de la malta.	Panela con dulzón de la malta, flores de Bach.
A caramelo	Sabor dulce leve y amarguito, agradables. Es muy importante establecer asociaciones claves.	Caña de azúcar
Sabores defectuosos		
Ahumado	Licores contaminados por humo de madera, diésel, u otro combustible; usualmente debido a secado artificial.	Humo de madera, combustible.
Mohoso	Describe licores con un sabor a tierra, humedad, guardado, generalmente debido a un mal secado. Podría percibirse un sabor dulzón inicialmente.	Sabor a musgo, tierra, pan viejo.

Fuente: APPCACAO (2012)

## 2.7. MARCO CONCEPTUAL

**Pasta de cacao.-** Es el producto moldeado, resultante del tostado, la molienda y el refinado del cacao en grano tras haberlo limpiado, secado y descascarillado

**Enzima.-** Una enzima es una proteína que actúa como catalizador (acelerador) de una reacción química en el organismo o en sustratos específicos. Las enzimas son protagonistas fundamentales en los procesos del metabolismo celular.

**Actividad enzimática.-** como la cantidad de enzima que transforma 1 mol de sustrato por segundo. Esta unidad se llama katal (kat). Como 1 mol son  $10^6$   $\mu$ moles y 1 minuto son 60 segundos, resulta que 1 katal equivale a  $60 \times 10^6$ U. Esta unidad es muy grande, de forma que se utilizan frecuentemente los submúltiplos como el microkatal ( $\mu$ kat,  $10^{-6}$  kat) o el nanokatal (nkat,  $10^{-9}$  kat).

**Compuestos fenólicos.-** Son un amplio grupo de sustancias químicas, considerados metabolitos secundarios de las plantas, con diferentes estructuras químicas y actividad, englobando más de 8.000 compuestos distintos. Estos compuestos actualmente ha despertado un reciente interés por sus propiedades antioxidantes y sus posibles implicaciones beneficiosas en la salud humana, tales como en el tratamiento y prevención del cáncer enfermedad cardiovascular y otras patologías de carácter inflamatorio.

## 2.8. HIPÓTESIS

### 2.8.1. General

Existen efectos de la enzima pectinolítica y levadura *Sacharomyces cerevisiae* en la fermentación y calidad fisicoquímica y sensorial del cacao.

### **2.8.2. Específicos:**

- La fermentación del cacao con enzima pectinolítica y levadura *Sacharomyces cerevisiae*, tiene efecto en el contenido de compuestos bioactivos del grano.
- Intervienen operaciones tecnológicas específicas en la fermentación del cacao con enzima pectinolítica y levadura *Sacharomyces cerevisiae*, para obtener granos de cacao que cumpla los estándares de calidad internacionales
- Mejora la aceptabilidad de la pasta de cacao a partir de grano fermentado mediante enzima pectinolítica y levadura *Sacharomyces cerevisiae*, en relación al fermentado espontáneamente.

## **CAPITULO III**

### **METODO**

La investigación se llevó a cabo en distrito y provincia de Chanchamayo, región Junín; en las instalaciones de la Escuela Profesional de Ingeniería en Industrias Alimentarias de la Universidad Nacional Daniel Alcides Carrión: Laboratorio de análisis Alimentos y tecnología de Alimentos. Laboratorio de Control de Calidad de la Facultad de Ingeniería en Industrias Alimentarias de la UNCP - Huancayo; Laboratorio de evaluación sensorial de la Cooperativa Agraria Cafetalera Pangoa – Satipo y Laboratorio de Análisis de bromatología de la UPCH – Lima.

#### **3.1. TIPO Y NIVEL DE INVESTIGACION**

El tipo de investigación fue experimental y aplicativo; puesto que el proceso fue experimental, los resultados obtenidos son secuela de aplicar tecnologías existentes, para fermentar cada unidad experimental; para explicar la actividad fisicoquímica, microbiológica y sensorial que se produce durante la operación de fermentación, de acuerdo a las características de cada tratamiento en estudio.

#### **3.9. DISEÑO DE LA INVESTIGACION**

El diseño de la investigación pertenece a los experimentos puros, debido a que se manipularon variables independientes para ver sus efectos sobre variables dependientes en una situación de control (Hernández *et al.*, 2010).

Los resultados de los tratamientos en estudio serán evaluados en el aspecto físico-químicos, fotoquímicas, microbiológicas y sensorial a nivel de pasta de cacao.

Los tratamientos en estudio de la investigación son seis, dos tratamientos usando como cultivo iniciador de fermentación la levadura *Saccharomyces cerevisiae* en dos porcentajes en relación al cacao fermentado; dos tratamientos usando como cultivo iniciador de fermentación la mezcla de levadura *Saccharomyces cerevisiae* y enzima pectinasa en dos porcentajes en relación al cacao fermentado; dos tratamientos usando cultivo como iniciador de fermentación la enzima pectinasa en dos porcentajes en relación al cacao fermentado. Para conocer los efectos en la calidad físico-química y sensorial que produce en el cacao, por fermentación usando estos insumos. En la tabla 10 se tiene los tratamientos.

Tabla N° 10:

*Tratamientos de la investigación*

Tratamiento	Código	Medio de cultivo (% en función a masa de cacao en baba)	
		Lev. <i>Saccharomyces</i> *	Enzima pectolítica**
T1	L1	0.05 %	0.0
T2	L2	0.10 %	0.0
T3	LE1	0.05 %	0.07 ml.
T4	LE2	0.10 %	0.14 ml
T5	E2	0.0	0.07 ml
T6	E2	0.0	0.14 ml

\*: Levadura *Saccharomyces cerevisiae*, instantánea granulada Fleishmann

\*\* : Enzima Pectinasa ROHAPECT® PTE

Fuente: Elaboración propia

Para la evaluación de las características del grado de fermentación del cacao y producto final (Granos: pizarrosos, violeta, con mohos, parcialmente fermentados y bien fermentados), se empleó el Diseño completamente al azar (DCA), para establecer la existencia de diferencias entre tratamientos se desarrolló el análisis de varianza (ANVA);



Para la clasificación de diferencias entre tratamientos se empleó la prueba de Tukey, a nivel de significancia de ( $\alpha=0,05$ ). El modelo matemático correspondiente a un DCA, (Gutiérrez y De la Vara, 2008). Tiene la ecuación siguiente:

$$Y_{ij} = \mu + \tau_i + \epsilon_{ij}$$

Dónde:

$Y_{ij}$ : Variable respuesta o dependiente (calidad de grado de fermentación)

$\mu$ : Efecto de la media General

$\tau$ : Efecto del tratamiento (característica de grado de fermentación)

$\epsilon_{ij}$ : Error del experimento

La evaluación sensorial se realizó con la finalidad de caracterizar el perfil de calidad organoléptico del licor (pasta) de cacao, mediante un panel de tres catadores especialistas, que evaluaron los atributos organolépticos de: olor/fragancia, acidez, amargor, astringencia, sabor/aroma, limpieza y post gusto; de acuerdo a la ficha de análisis sensorial de APPCACAO (2016), que se adjunta en el anexo 4. Para la evaluación se empleó el Diseño de bloques completo al azar (DBCA), con arreglo factorial de 3 x 2, para establecer la existencia de diferencias entre tratamientos se desarrolló el análisis de varianza (ANVA); Para la clasificación de diferencias entre tratamientos se empleó la prueba de Tukey, a nivel de significancia de ( $\alpha=0,05$ ), (Gutiérrez y De la Vara, 2008). Cuyo modelo aditivo lineal, del diseño experimental es:

$$Y_{ij} = \mu + \tau_i + \gamma_j + \epsilon_{ij}$$

Donde:

$Y_{ij}$ : Variable respuesta o dependiente

$\mu$ : Efecto de la media General

$\tau_i$  Efecto de los tratamientos en estudio ( $i = L1, L2, LE1, LE2, E1, E2$  y Testigo)

$\gamma_j$ : Efecto de cantidad de los catadores ( $j= 1, 2, 3$ )

$E_{ij}$  = Error del experimento.

En el caso de la levadura, la parte fermentecible, del cacao es el 40% de la unidad experimental (3.5 kg), que representa 1.4 kg, la cantidad de levadura es el 0.05 y 0.10 % de esta cantidad

### **3.10. ETAPAS DE LA INVESTIGACION**

Para el desarrollo de la parte experimental se desarrollará de acuerdo al diagrama de flujo de la figura 8.

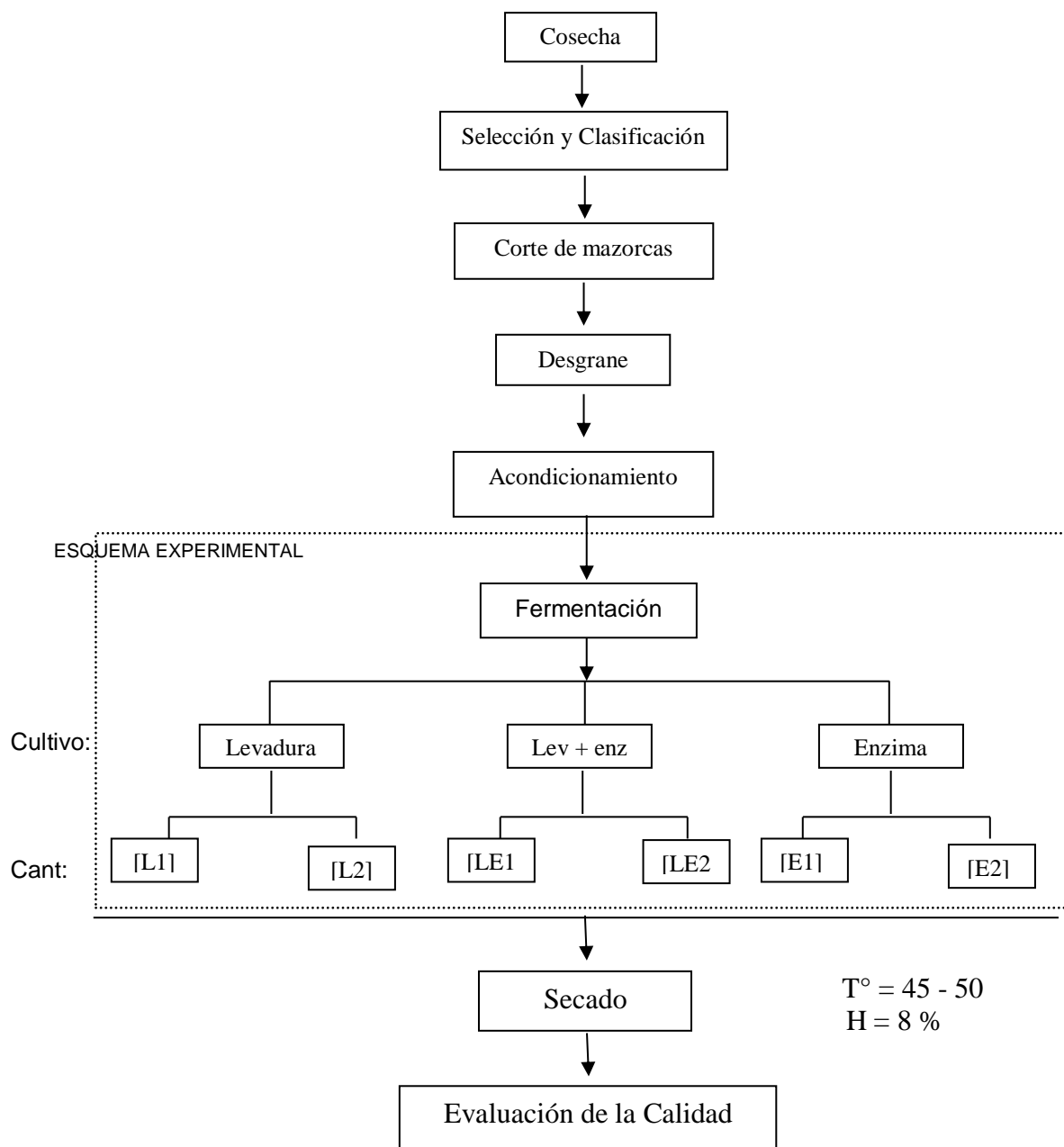


Figura 8. Diagrama de flujo para la evaluación del efecto de la adición de enzima pectolítica y levadura *Saccharomyces cerevisiae* en la fermentación y calidad del cacao.

### 3.3.1. Descripción del proceso experimental

**Cosecha.** Se cosechó los cacaos variedad criollo, maduros fisiológica y organolépticamente aptos para la correcta fermentación.

**Selección y Clasificación.** Se tomaron muestras representativas de la variedad Criollo, cultivadas en la zona, los que fueron evaluados en el aspecto físico y sensorial, seleccionando mazorcas sanas y maduras.

**Corte de mazorcas.** Consistió en el quebrar con un machete de acero inoxidable las mazorcas con la finalidad de facilitar la extracción de las semillas.

**Desgrane.** Consistió en extraer las semillas del interior de la mazorca, para ser expuestas a las condiciones de fermentación.

**Acondicionamiento.** Se pesó 3.50 kg, iguales de granos de cacao desgranado en baba, colocándose en cada fermentador hecho de madera palo de balsa, (dimensión: 0.2 x 0.2 x 0.2 m.), anticipadamente acondicionado con fermentaciones previas; donde se adicionó los cultivos iniciadores a cada unidad de experimentación, de acuerdo a características de cada tratamiento, se homogenizó adecuadamente los granos de cacao con el cultivo iniciador en las cajas de fermentación.

**Fermentación.** Es la operación fue donde ocurrió la mayoría de cambios bioquímicos, existiendo cambios notables en la estructura del grano tales como la descomposición del mucílago azucarado que cubre el grano fresco, la transformación en alcoholes, ácidos, disminución de pH produciendo un conjunto de reacciones bioquímicas que formaron el desarrollo de sabor y aroma del chocolate, por acción de las levaduras y las bacterias lácticas y acéticas.

Para el presente estudio se utilizaron tres tipos de cultivos iniciadores: 1: Levadura, 2: Levadura + enzima, 3: enzima; dos cantidades de cada uno de ellos, según se indica en las variables de estudio y el diseño de investigación que se establece en la tabla 10.

**Secado.** Se llevó a cabo sobre mallas de acero cubierto con tela de nylon, en parihuelas a 10 cm de altura del piso de cemento, cuya temperatura fluctuó de 25 a 34 °C, por un periodo de tiempo 40 a 25 horas; hasta que el grano llegue a una humedad menor a 7.5 %.

**Envasado.** Se realizó en bolsas transparentes de polietileno de alta densidad, a fin de evitar que absorba humedad.

**Evaluación de producto terminado.** El grano de cacao fermentado seco se sometió a diversas evaluaciones físico-químicas y sensoriales a fin de establecer la calidad de cada tratamiento en estudio.

### **3.3.2. Métodos de análisis**

#### **A. Caracterización de la materia prima**

##### **a. Análisis fisicoquímico de la materia prima**

- Sólidos solubles del mucilago. Método A.O.A.C. 1996
- pH del mucilago. Método AOAC. 981.12. 2005.
- pH del cotiledón. Método AOAC. 981.12. 2005
- Acidez titulable del mucilago. Método A.O.A.C.931.23 1990.
- Acidez titulable del cotiledón. Método A.O.A.C.931.23 1990
- Humedad de grano. Método A.O.A.C.931.04. 2005

##### **b. Características biométricas**

- Tamaño de mazorcas. Con vernier
- Peso de mazorcas. Con balanza de precisión
- Tamaño de 10 almendras. Medido con vernier
- Peso de 100 almendras. Con balanza de precisión
- % de pulpa y cáscara

## **B. Análisis durante el proceso**

### **a. Análisis fisicoquímico**

- Temperatura de fermentación cada 6 horas. Con termómetro digital
- pH : con Potenciómetro a 20 °C. Método AOAC. 981.12. 2005
- Acidez titulable del mucilago. Método AOAC.931.23 1990.
- Acidez titulable del cotiledón. Método AOAC.931.23 1990.
- Sólidos solubles del mucilago, con refractómetro, marca Atago a 20 °C. Método AOAC. 1996
- Sólidos solubles del cotiledón, con refractómetro marca Atago a 20 °C. Método AOAC. 1996.
- Tiempo de fermentación, en horas. Con cronometro
- Temperatura de secado. Con termómetro digital
- Tiempo de secado. Con cronometro
- Humedad de grano de cacao. Método AOAC.931.04. 2005
- Contenido de alcohol. Mediante método de refractómetro Pocket marca Atago.  
(Para porcentaje de alcohol)
- Contenido de ácido acético. Mediante método refractómetro Pocket marca Atago.  
(Para porcentaje de ácido acético)

### **b. Análisis microbiológico**

- Hongos y levaduras. Método. Método ISO 7954. 2003
- Bacterias acéticas. Método 7932. 2003

## **C. Análisis de producto secado**

### **a. Evaluación fisicoquímica**

- Contenido de cenizas. Método NTP 208.015. 2001

- Contenido de ácido acético. Mediante método refractómetro Pocket marca Atago. (Para porcentaje de ácido acético).
- Humedad de grano. Método AOAC.931.04. 2005
- Índice de fermentación: (% de granos fermentados). Método NTP-ISO 1114. 2006
- Porcentaje de granos defectuosos en producto final (granos mohosos, pizarrosos, violáceos etc.). NTP-ISO-1114. 2006
- Contenido de polifenoles. Método Folin-Ciocalteu, propuesto por Singleton et al. 2001.
- Contenido de antioxidantes totales. Método descrito por Brand-Williams, Cuvelier y Berset (1995), de inhibición del radical DPPH.
- Contenido de teobromina. Método de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC).
- Hongos y levaduras. Método. ISO 7954. 2003
- Bacterias acéticas. Método. ISO 7953.2003, en medio estándar GYC

#### **b. Pruebas de Evaluación Sensorial**

Se realizó en el grano de cacao fermentado seco y tostado, luego procesado como licor de cacao, con la finalidad de caracterizar el perfil sensorial a través de 3 panelistas expertos, se evaluó los atributos: olor, acidez, amargor, astringencia, sabor/aroma, limpieza, post gusto y puntaje de catador; empleando la ficha de evaluación de *normas* y estándares de la APPCACA - Perú (anexo 2 y 3).

### **3.4. ESTRATEGIAS DE PRUEBA DE HIPÓTESIS**

#### **Hipótesis nula**

H<sub>0</sub>: No existen efectos de la enzima pectolítica y levadura *Sacharomyces cereviseae* en la fermentación y calidad fisicoquímica y sensorial del cacao, en ninguno de los tratamientos

$$H_0: \tau_1 = \tau_2 = \tau_3 = \tau_4 = \tau_5 = \tau_6 = 0$$

#### **Hipótesis de la investigación**

H<sub>1</sub>: Existen efectos de la enzima pectolítica y levadura *Sacharomyces cereviseae* en la fermentación y calidad fisicoquímica y sensorial del cacao en algún tratamiento.

$$H_1: \tau_i \neq 0$$

### **3.5. VARIABLES EN ESTUDIO**

#### **3.5.1. Variables independientes:**

- Tipo cultivo Iniciador
- Cantidad de cultivo iniciador

#### **3.5.2. Variables dependientes:**

- Tiempo de fermentación
- Características fisicoquímicas del cacao
- Contenido de compuestos bioactivos:
- Características sensoriales de la pasta de cacao

### **3.6. POBLACION**

La población de producción de cacao (*Theobroma cacao*), variedad Criollo, posee varios clones, en las fincas normalmente se halla una mezcla de estos clones, La finca seleccionada



es Todos los Santos, del distrito de Pangoa, provincia de Satipo, región Junín. El desarrollo experimental se realizó en el distrito y provincia de Chanchamayo, región Junín. La unidad experimental fue de 3.5 Kg/tratamiento, haciendo un total de 26 Kg (6 tratamientos en estudio y un tratamiento testigo)

### **3.7. MUESTRAS**

3.5 kilogramos de cacao en baba por tratamiento (total 26 kg), 68 kg de mazorcas de cacao, cosechados del fundo Todos los Santos, agricultor líder en cultivo de cacao. Ubicado en el distrito de Pangoa, provincia de Satipo; cuya temperatura varía de 24 a 33 °C; con cosecha promedio de 800 kg/Ha, a una altitud de 600 a 650 m.s.n.m.

### **3.8. TECNICAS DE INVESTIGACION**

#### **3.8.1. Instrumentos de recolección de datos**

- Laboratorios de investigación, documentos de investigación, bibliografías, hemerografías e internet.
- Los datos de la evaluación del proceso experimental se recogieron en fichas de proceso y análisis, para cada tratamiento.

#### **3.8.2. Instrumento de recolección de información en laboratorio**

**Equipos:** Balanza digital, cap. 100gr., precisión 0.001 gr. marca Digiweigh; balanza analítica, Ohaus® Adventurer, modelo AR3130, cap. Max. 310 g, resolución 0,0001 g; Balanza de 5 kg., marca ELECTRONIC KITCHEN SCALE modelo SF 400; Potenciómetro rango de 0-32% Brix marca Link JAPAN modelo RHB – 32ATC; Equipo de titulación capacidad de 25 ml. marca Germany Marienfeld; Medidor de humedad marca WILE (COFFE/COCOA), rango de 0 – 30 % de humedad; pH metro digital marca CHECKER HANNA, rango 0 – 14 pH; Refractómetro rango 0 – 80

°Brix, marca HANNA; Termómetro digital con vástago rango: -50°C – 300°C; Vernier calipers (BULLTOOLS, professional/150 \*0.02 MM – 6”\*1/1000 IN; Horno eléctrico (NEX EO - 900) potencia 700 W, cap., 9L; Molino eléctrico (BOSCH MKM6003, potencia 180W, cap., 75gr.; Licuadora marca Osterizer de cuatro velocidades cap. 1.5 lt.; Refrigeradora marca Coldex capacidad 292 lt.; Estufa marca FARLL KOLB modelo 0-6072 DRIECH – WEST Germany; Mufla marca BARNSTEAD THERMOLYNE modelo FB1310M-26; Espectrofotómetro, marca Shimadzu UVIZOS con rangos de longitud de onda de 200-1100; Estufa CV-55670VLW W5903; Rotavapor 2L. marca BUCCHI; Balanza analítica Marca E. METTLER TOLEDO; Baño maría termo regulable, marca HANNA; homogenizador de soluciones Wizard & Classic Velp®, modelo VL-F202A0175, velocidad max. 3000 rpm, movimiento orbital; estufa-esterilizadora con aire forzado de 54 L, colorímetro de campo; Microscopio marca LECCA; Incubadora Marca: WTC Brinder, Procedencia: Germany; Micropipeta, Marca: CE, Modelo: Pipet4u, Procedencia: Alemania, Capacidad: 100 – 1000 ul; Autoclave Vertical, Marca: M.R.C LTD, Modelo: LDZM-60KSC; Balanza Analítica, marca: Sartorius, Marca: AZ2101, Capacidad Max:210,000g; Baño María con agitador VIBROTHERM labor MUSZE; Contador de Colonias, Marca: HELLIGE, Procedencia: USA; refractómetro Pocket marca Atago. (Para porcentaje de alcohol); refractómetro Pocket marca Atago (para porcentaje de ácido acético); Equipo de HPLC. **Materiales y reactivos:** Cuchillos, espátula, frascos de dilución (100 y 250ml), fiolas (25, 50, 100ml), gradillas, matraz (250 y 500ml), plumón indeleble, papel crakc, pabilo, placas petri, placas petri con división, pizetas, pinza metálica, probeta (100, 200 y 500ml), pipetas graduadas (5 y10 ml), tubos de ensayos (20ml), papel aluminio, papel toalla, termómetro de escala de 0 a 100 °c, tina, tijera, varilla de vidrio, vasos precipitados

de (50, 100 y 150ml); vasos de precisión (50, 100, 200, 500 y 1000 ml), baguetas, bombilla de succión, cubetas de vidrio para mediciones espectrofotométricas, embudos de vidrio, erlenmeyers de 100 ml y 250 ml, fioles de 5 ml, 25 ml, 50 ml, 100 ml y 250 ml, papel filtro Whatman nº 1 y 2, desecador de vidrio, mortero con pilón de porcelana, cápsulas de porcelana, tubos de ensayo de Pyrex con rosca de 5 ml, mesas de acero inoxidable, ventilador con fuente , couler de 10 l, piceta; otros materiales que requieren los procedimientos.

Acetato de sodio pH 4,5; ácido clorhídrico 1.5 N; cloruro de potasio pH 1; etanol 96%; metanol; Folin Ciocalteau; DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl); hidróxido de sodio 0.1N; fenolftaleína; medio estándar GYC (para bacterias acéticas); agar baird Parker; agar Plate count; hexano; peptona; agua destilada; otros.

### **3.8.3. El procesamiento y análisis de datos**

El procesamiento y presentación de datos se hizo empleando el software Microsoft office 2010, con el programa de texto Word y hoja de cálculo Excel, el programa estadístico Minitab 16 y Stahatic graphic Plus 5; el análisis se realizaron con los resultados estadísticos comparando con datos de otras investigaciones, normas técnicas de calidad y datos existentes garantizados.

## CAPITULO IV

### PRESENTACION DE RESULTADOS

#### 4.1. CARACTERIZACION DEL CACAO

La evaluación del cacao cosechado es importante para conocer qué calidad se puede obtener como cacao fermentado seco.

**Tabla 11:**

*Características físicas del cacao cosechado fresco*

Características	I	II	II	Promedio
Peso de la mazorca	831.00	805.00	740.00	792.00
Peso de los granos de cacao en baba	265.00	242.00	213.00	240.00
Peso de cáscara (concha)	566.00	563.00	527.00	552.00
Relación % de pulpa - cascara	31.89	30.06	28.78	30.25
N° de granos por mazorca	48.00	46.00	44.00	46.00
Largo de la mazorca	24.70	22.20	21.60	22.83
Ancho de la mazorca	10.50	10.10	9.40	10.00
color de la mazorca	amaro pálido	marrón amar	amar. Firme	
Largo promedio de 10 granos	3.00	2.60	2.50	2.70
Ancho promedio de 10 granos	1.70	1.50	1.50	1.57
Espesor promedio de 10 granos	0.80	0.70	0.80	0.77
peso húmedo de 100 granos	446.80	425.20	393.10	421.70
Color del cotiledón	Lila	Lila	Morado	
Color de la pulpa	Blanco	Blanco	Blanco	

Fuente: Elaboración propia.

La calidad del cacao se forma desde el cultivo, luego en el proceso de fermentación, secado y tostado; de acuerdo a la tabla 11, estas características permitieron desarrollar una fermentación adecuada. El cacao criollo o nativo presentó mazorcas de tamaño mediano,

alargadas con la punta aguda recta o curvada, con cáscara poca rugosa con 10 surcos, de color amarillo a pardo, en algunos caso hacia el color amarillo-guindo; se caracterizaron por tener mediana cantidad de semillas grandes blancas o ligeramente pigmentadas, cilíndricas u ovals y aromáticas, se considera de alta calidad por ser muy agradables.

**Tabla 12:**

*Características fisicoquímicas del cacao cosechado fresco*

Características	I	II	II	Promedio
Grados brix del grano	0.00	0.00	0.00	0.00
Grados brix del mucilago	17.00	17.20	17.00	17.07
pH del grano	7.40	7.80	7.50	7.57
pH del mucilago	4.50	4.60	4.50	4.53
Acidez titulable del mucilago (%)	0.80	0.70	0.80	0.77
Humedad del grano	41.87	42.13	44.14	42.71
Índice de madurez del grano	21.25	24.57	21.25	22.36
cenizas	2.37	2.68	2.32	2.46

Fuente: Elaboración propia.

En la tabla 12, se aprecia los análisis de los sólidos solubles (grados brix), pH, acidez titulable del mucilago y grano, humedad e índice de madurez del cacao fresco; estos datos eran importantes conocer, para observar el desarrollo de la fermentación, puesto que estas características condicionan directamente este proceso y la calidad del grano de cacao.

#### **4.2. CARACTERISTICAS FISICOQUIMICAS DURANTE PROCESO DE FERMENTACION DEL CACAO**

En el anexo 2, se presenta las características fisicoquímicas, que se presentan durante la fermentación, como temperatura de fermentación, pH del mucilago y cotiledón, acidez

titulable del mucilago y cotiledón, humedad, sólidos solubles expresados en gados brix, porcentaje de alcohol y ácido acético.

#### 4.2.1. Temperatura de fermentación

La temperatura es importante en el proceso de fermentación, donde ocurren diversos cambios fisicoquímicos y microbiológicos y como consecuencia el desarrollo del perfil sensorial del cacao; en el desarrollo de la fermentación completa y parejo, permitiendo el desarrollo y actividad de las levaduras, bacterias lácticas y acéticas; en tal sentido se tiene en la tabla 13 y figura 9, la tendencia del comportamiento de la temperatura, durante el proceso de fermentación, e indica el desarrollo típico de una buena fermentación.

**Tabla 13:**

*Evaluación de la temperatura durante la fermentación*

Tiempo (Hras)	L1	L2	LE1	LE2	E1	E2	T
0	25.4	25.4	25.4	25.4	25.4	25.4	25.4
12	26.0	26.0	27.0	27.5	25.7	25.8	25.9
24	27.5	27.0	28.0	27.8	27.0	26.6	26.8
36	29.4	29.2	29.0	28.3	28.3	27.7	27.8
48	31.5	30.5	29.8	29.3	30.0	30.5	29.7
60	34.1	30.4	30.8	32.5	33.5	37.5	29.6
72	36.8	32.8	33.1	37.5	35.1	39.8	32.0
84	40.7	37.2	40.3	40.7	38.1	42.3	37.1
96	45.3	43.6	43.6	42.5	41.9	43.6	41.7
108	45.7	45.4	46.1	45.1	47.3	48.1	42.3
120	41.1	39.8	40.3	42.0	41.3	42.2	48.0
132	39.2	42.8	37.8	41.1	35.5	35.1	41.3
144	37.8	38.0	37.3	37.7			40.9

Fuente: Elaboración propia

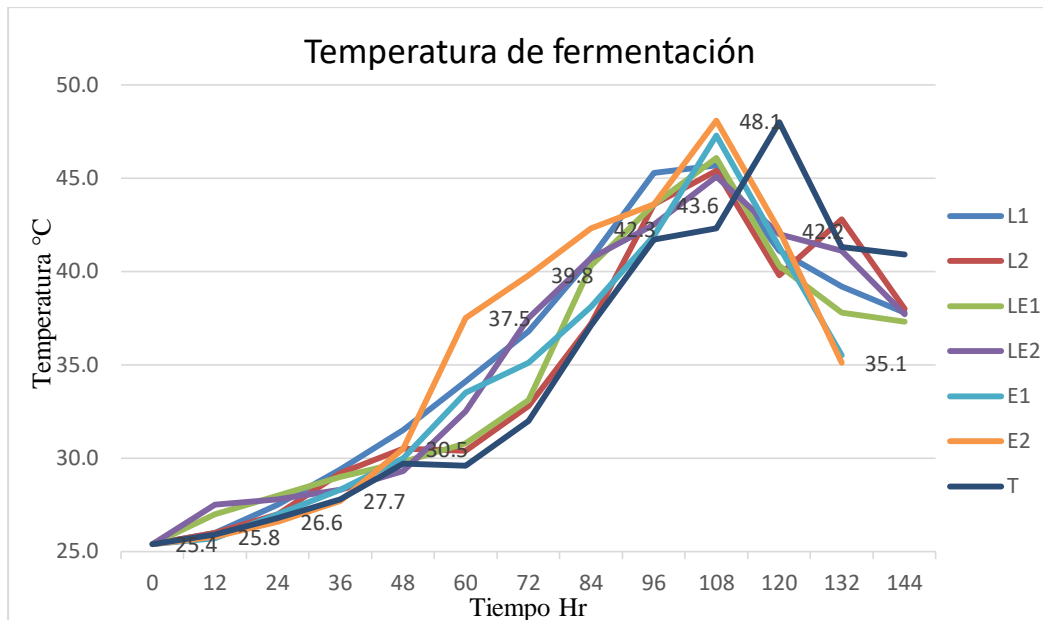


Figura 9: Tendencia de la temperatura durante la fermentación del cacao

Fuente: elaboración propia.

#### 4.2.2. pH durante de la fermentación

En todo proceso de fermentación, el control del pH es de suma importancia, puesto que los microorganismos y las enzimas de los microorganismos realizan una mejor actividad a un pH adecuado o más propiamente llamado pH óptimo del sustrato, en este caso el mucilago y cotiledón del grano de cacao; para cuya determinación en forma precisa se utilizó un potenciómetro o también llamado pH-metro digital con compensador de temperatura, de lectura directa.

##### a. pH del mucilago

El mucilago es el medio donde se desarrolla prácticamente la fermentación, El pH del mucilago no es un valor constante, varía en el curso de la fermentación, por efectos de la temperatura, desarrollo y metabolismo de los microorganismos presentes.

**Tabla 14:**

*Evaluación del pH de mucílago de cacao durante la fermentación*

Tiempo (Hras)	L1	L2	LE1	LE2	E1	E2	T
0	4.5	4.5	4.5	4.5	4.5	4.5	4.5
12	3.9	3.9	3.9	3.8	4.1	4.1	4.3
24	3.6	3.5	3.6	3.5	3.8	3.8	4.2
36	4.2	4.0	4.1	4.5	4.3	4.5	4.6
48	5.0	5.0	5.0	5.2	5.0	5.0	5.1
60	5.0	4.9	5.1	4.9	4.9	4.7	4.8
72	5.0	4.8	4.6	4.6	4.6	4.6	4.5
84	4.9	4.8	4.7	4.6	4.8	4.8	4.6
96	4.9	4.7	4.7	4.6	4.9	4.9	4.6
108	4.7	4.7	4.8	4.7	4.6	4.8	4.7
120	4.6	4.6	4.8	4.7	4.6	4.8	4.7
132	4.5	4.6	4.5	4.4	4.5	4.5	4.6

Fuente: Elaboración propia.

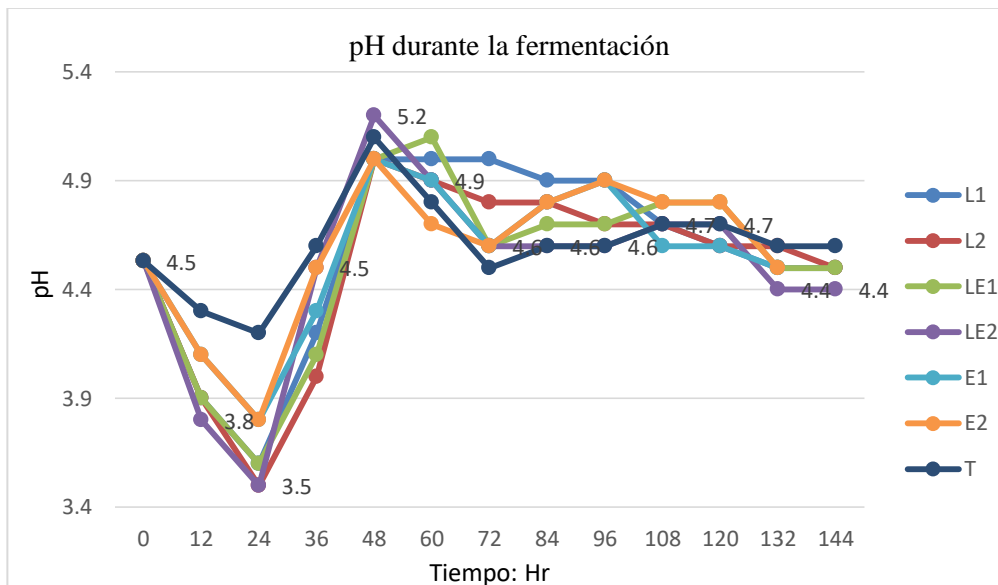


Figura 10: Tendencia del pH del mucílago de cacao durante la fermentación

Como se reporta en la tabla 14 y figura 10, al inicio de la fermentación hay descenso de valores de pH 4.5 hasta pH de 3.5 en el caso del tratamiento L2 a las 24 horas de proceso,



luego asciende hasta pH 5.1 a las 60 horas de proceso, para posteriormente estabilizarse en valores de pH de 4.5 y 4.6 al final de la fermentación.

## b. pH del cotiledón del cacao

**Tabla 15:**

*Evaluación del pH del cotiledón de cacao durante la fermentación*

Tiempo (Hrs)	L1	L2	LE1	LE2	E1	E2	T
0	7.5	7.5	7.5	7.5	7.5	7.5	7.5
12	7.4	7.4	7.0	7.3	7.3	7.3	7.3
24	7.2	7.2	6.8	7.2	7.1	7.1	7.1
36	6.5	7.0	6.2	6	6.8	5.8	6.1
48	5.3	6.8	5.0	5.1	6.6	4.9	5.1
60	5.1	6.2	4.8	4.9	6.1	4.8	4.9
72	4.6	5.0	4.7	4.7	4.6	4.6	4.6
84	4.6	4.9	4.7	4.7	4.7	4.6	4.7
96	4.6	4.8	4.7	4.8	4.9	4.8	4.7
108	4.7	4.8	4.8	4.8	4.6	4.8	4.7
120	4.6	4.6	4.8	4.7	4.6	4.8	4.7
132	4.5	4.6	4.5	4.4	4.5	4.5	4.6
144	4.5	4.5	4.5	4.4			4.6

Fuente: Elaboración propia.

El pH del cotiledón indica el grado de difusibilidad que existe de los iones hidrógeno (H) del mucílago hacia el interior del grano; inicialmente el grano tiene un pH de 7.5, que indica un grano ligeramente alcalino, durante la fermentación el pH varía sostenidamente hasta llegar a un valor estable de pH 4.5, al final de la fermentación, igualando con el valor del mucílago, tal como se aprecia en el cuadro 15 y figura 11.

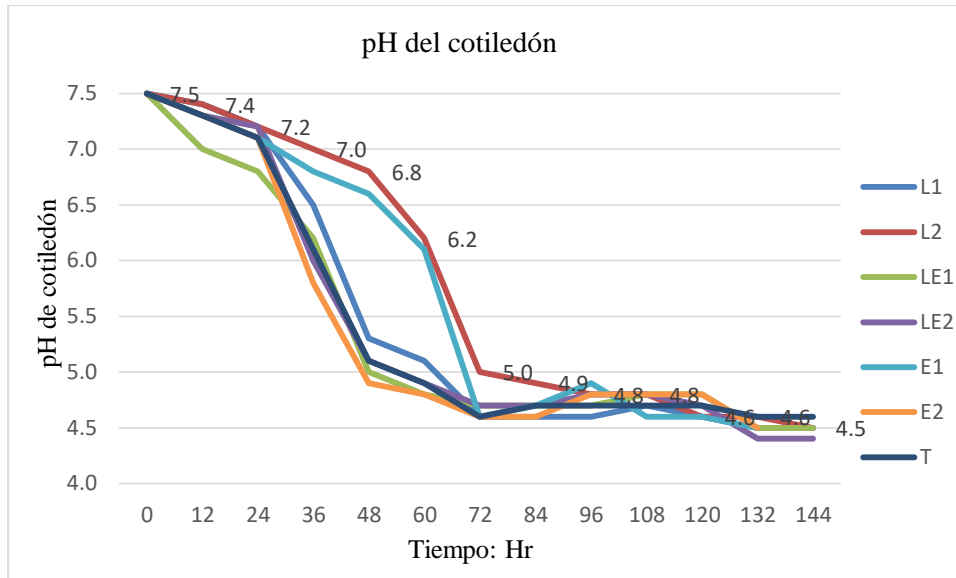


Figura 11: Tendencia del pH del cotiledón de cacao durante la fermentación

#### 4.2.3. Acidez titulable en la fermentación

En alimentos el grado de acidez indica el contenido de ácidos libres. Se determina mediante una valoración volumétrica de la alícuota del cacao con un reactivo básico, en este caso con hidróxido de sodio (NaOH), en presencia de un indicador de color fenolftaleína (C<sub>20</sub>H<sub>14</sub>O<sub>4</sub>). El resultado se expresa como % del ácido predominante en el material, en caso del cacao en función del ácido cítrico y ácido acético. Para el cálculo se empleó la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Acidez} = \frac{V_b \times N \times \text{Milieq} \times 100}{V_a}$$

Donde:

V<sub>b</sub>: volumen en ml, gastado por la base.

N: normalidad de la base.

Milieq: mili equivalente de ácido cítrico o ácido acético.

V<sub>a</sub>: volumen de la alícuota.

Factor de acidez de ácido cítrico: 0.064

Factor de acidez ácido acético: 0.060

**a. Acidez titulable del mucilago**

**Tabla 16:**

*Evaluación de acidez del mucílago de cacao durante la fermentación (% de ácido cítrico)*

Tiempo (Hrs)	L1	L2	LE1	LE2	E1	E2	T
0	1.28	1.28	1.28	1.28	1.28	1.28	1.28
12	1.22	1.22	1.22	1.25	1.09	1.09	1.09
24	1.15	1.18	1.18	1.15	1.06	1.06	0.80
36	0.90	0.83	0.90	0.90	1.02	0.83	0.70
48	0.51	0.58	0.58	0.77	0.96	0.83	0.64
60	0.58	0.32	0.54	0.70	0.90	0.80	0.58
72	0.58	0.51	0.51	0.64	0.90	0.77	0.54
84	0.51	0.64	0.51	0.64	0.77	0.70	0.51
96	0.51	0.77	0.45	0.64	0.58	0.64	0.51
108	0.58	0.77	0.38	0.61	0.51	0.51	0.54
120	0.58	0.70	0.51	0.58	0.64	0.58	0.58
132	0.64	0.70	0.64	0.51	0.70	0.64	0.64
144	0.70	0.70	0.77	0.51			0.64

Fuente: Elaboración propio.

La acidez titulable constituye fundamentalmente, una medida de la concentración de proteínas y de fosfatos, en este caso en el mucílago del cacao, este factor esta en relación al índice de madurez del cacao, en esta investigación se determinó una acidez inicial de 1.28 % de ácido cítrico, el cual va cayendo en función al agotamiento del mucilago a valores de 0.51 a 0.77 % de ácido cítrico, de acuerdo a las características de fermentación de cada tratamiento en estudio; cuya variabilidad se aprecia en la tabla 16 y figura 12

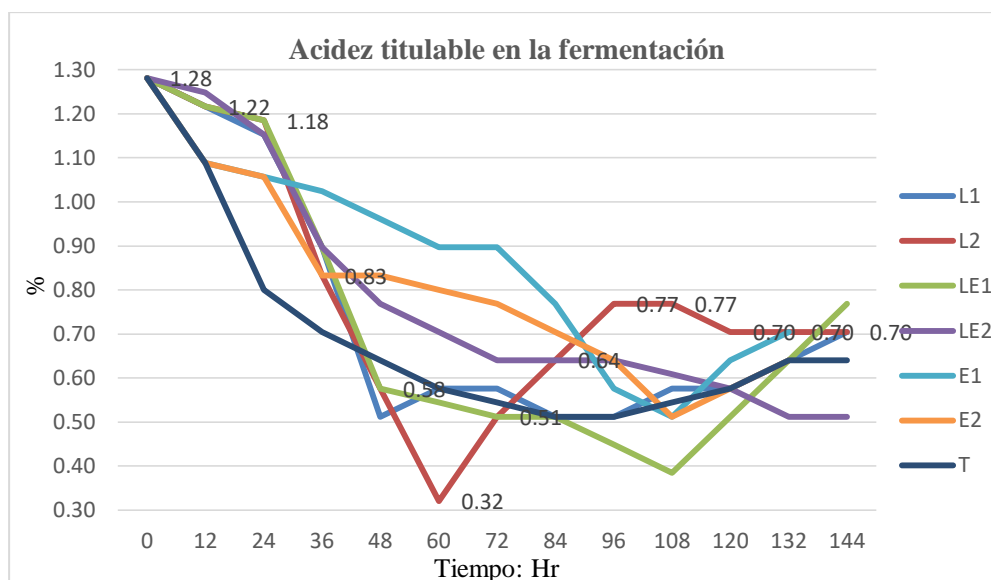


Figura 12: Tendencia de acidez del mucílago de cacao durante la fermentación

## b. Acidez titulable del cotiledón del cacao

**Tabla 17:**

*Evaluación de acidez del cotiledón de cacao durante la fermentación*

Tiempo (Hrs)	L1	L2	LE1	LE2	E1	E2	T
0	0.29	0.29	0.29	0.29	0.29	0.29	0.29
12	0.35	0.35	0.32	0.32	0.32	0.32	0.32
24	0.38	0.38	0.45	0.38	0.38	0.35	0.38
36	0.42	0.38	0.38	0.38	0.42	0.38	0.42
48	0.45	0.42	0.35	0.35	0.45	0.45	0.45
60	0.38	0.38	0.35	0.35	0.45	0.45	0.51
72	0.32	0.45	0.38	0.32	0.51	0.51	0.38
84	0.38	0.51	0.38	0.38	0.51	0.54	0.45
96	0.38	0.70	0.38	0.45	0.45	0.58	0.48
108	0.45	0.77	0.32	0.51	0.51	0.58	0.51
120	0.58	0.70	0.45	0.58	0.64	0.64	0.58
132	0.64	0.70	0.64	0.51	0.70	0.64	0.64
144	0.70	0.70	0.77	0.51			0.64

Fuente: Elaboración propio

En el caso de la acidez del cotiledón de cacao, sucede lo inverso del mucilago, como cacao fresco presenta una acidez de 0.29 % de ácido cítrico, que va incrementándose a medida que transcurre el tiempo de fermentación, actividad de los microorganismos y cambios bioquímicos; aquí se presenta el fenómeno de disusibilidad de ácidos, hasta llegar a un equilibrio de acidez entre el cotiledón y mucilago al final de la fermentación que varía de 0.51 a 0.77 % de ácido cítrico.

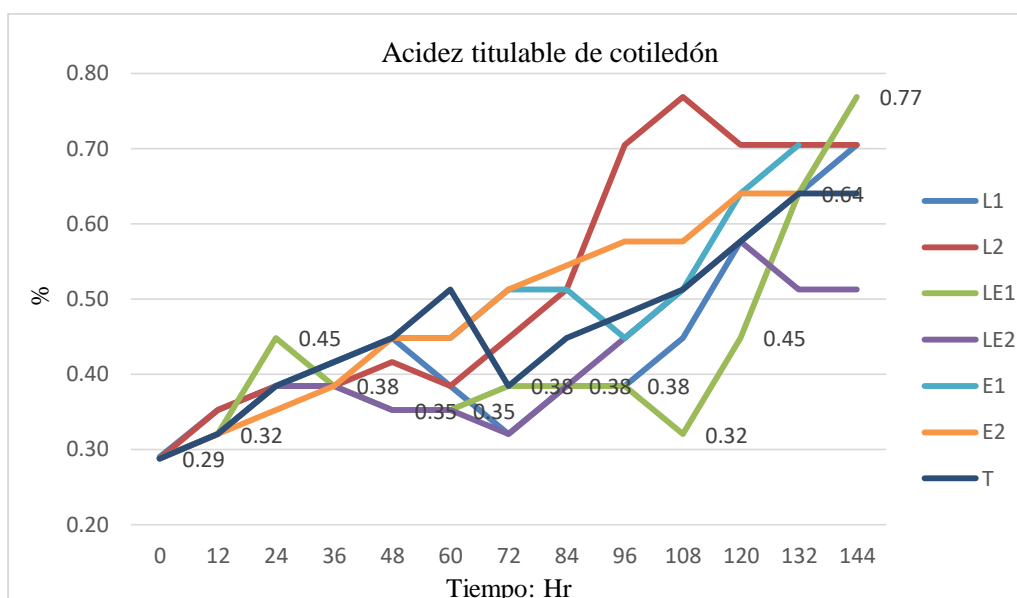


Figura 13: Tendencia de acidez del cotiledón de cacao durante la fermentación

#### 4.2.4. Contenido de sólidos solubles en fermentación del cacao

Los sólidos solubles representan mayormente el contenido de azúcares presentes en el mucilago los cuales son consumidos y transformados principalmente por las levaduras durante la primera fase de la fermentación, va depender de la cantidad de sólidos solubles en el mucílago el grado de alcohol que se produce y como consecuencia la cantidad de ácido acético producido en la etapa final de la Fermentación. En la tabla 18 y figura 13 se presenta la tendencia de agotamiento de los azúcares en los diferentes tratamientos; al inicio el mucílago posee 17.1 % de solidos solubles, agotándose totalmente a los 72 y 84 horas

totalmente. En el caso del cotiledón los sólidos totales son 0 % en todo el proceso de fermentación, no existe el fenómeno de difusibilidad.

**Tabla 18:**

*Evaluación de sólidos solubles del mucilago de cacao durante la fermentación*

Tiempo (Hrs)	L1	L2	LE1	LE2	E1	E2	T
0	17.10	17.10	17.10	17.10	17.10	17.10	17.10
12	16.00	14.20	15.00	13.50	16.00	16.00	16.00
24	14.00	11.50	11.00	11.00	15.00	14.00	15.00
36	11.00	6.50	6.00	8.00	7.00	8.00	10.00
48	7.00	4.40	4.00	6.00	3.00	2.00	7.00
60	4.00	2.00	2.00	3.00	1.00	1.00	4.00
72	1.00	1.00	1.00	2.00	0.00	0.00	2.00
84	0.50	0.50	0.00	1.00	0.00	0.00	1.00
96	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
108	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
120	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
132	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00

Fuente: Elaboración propio

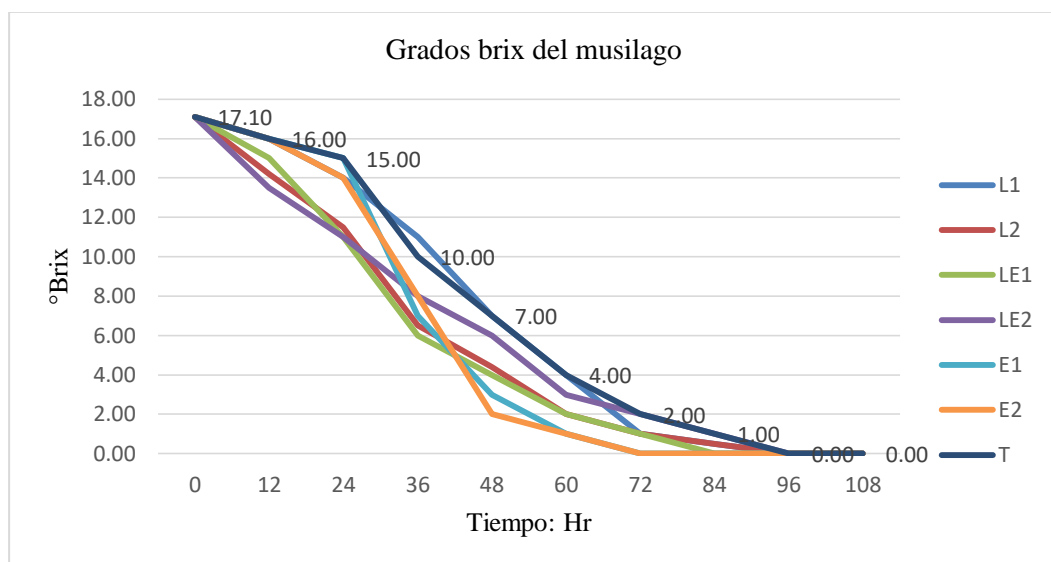


Figura 14: Tendencia de solidos solubles del cotiledón de cacao durante la fermentación

#### 4.2.5. Contenido de alcohol en fermentación del cacao

**Tabla 19:**

*Evaluación de contenido alcohol en grano de cacao durante la fermentación*

Tiempo (Hrs)	L1	L2	LE1	LE2	E1	E2	T
0	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
12	0.20	0.20	0.25	0.25	1.10	1.20	0.20
24	0.60	0.70	0.86	0.70	2.00	2.20	0.60
36	1.20	1.40	1.60	1.50	3.80	4.10	1.50
48	2.60	3.30	3.00	2.70	4.50	4.80	3.50
60	6.10	4.50	5.10	5.00	7.10	7.50	4.70
72	10.00	6.90	10.10	9.90	11.10	11.40	6.90
84	6.80	10.20	9.40	9.20	10.20	10.10	10.50
96	5.20	5.20	7.50	7.20	6.40	6.60	6.20
108	3.90	4.50	6.80	6.50	4.90	4.70	4.20
120	2.80	3.70	5.90	5.60	4.10	3.90	3.40
132	2.10	3.00	3.70	3.30	2.80	2.80	3.00
144	1.50	2.60	2.60	2.60			2.80

Fuente: Elaboración propio

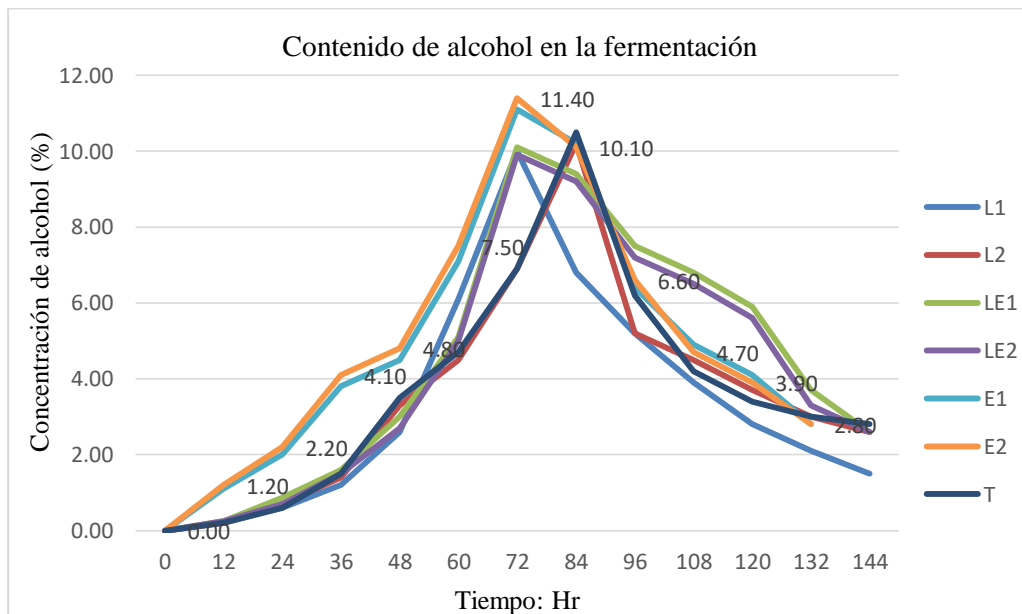


Figura 15: Tendencia de contenido de alcohol en granos de cacao durante la fermentación

La producción de alcohol durante la fermentación de sólidos solubles, por acción de las levaduras en la primera parte de la fermentación del cacao, es importante para la producción del ácido acético y como consecuencia la calidad del cacao fermentado y seco. Los ácidos acéticos son producto de la actividad de las bacterias acéticas, para que ocurra esta transformación deben existir las condiciones apropiadas de acidez, pH, concentración del alcohol, nutrientes (proteínas en el mucilago de cacao). Cuando se produce la actividad de las bacterias acéticas en la superficie del cacao se produce una fermentación aerobia y se convierte el alcohol en ácido acético. La determinación de contenido de alcohol en la fermentación se realiza con refractómetro Pocket marca ATAGO. (Para porcentaje de alcohol).

En la tabla 19 y figura 15, se presenta los datos de contenido de alcohol durante la fermentación, inicia el proceso con 0.0 % de alcohol, a las 12 horas ya se tiene la presencia de 0.20 % de alcohol, siendo la tendencia a incrementar hasta 11.40% de alcohol en el tratamiento E2, a las 72 horas, luego decrece hasta 1.5 a 2.8 % de alcohol al final de la fermentación.

#### **2.4.6. Humedad del cacao en la fermentación**

La humedad es un factor importante para el desarrollo de la fermentación del grano de cacao, principalmente para el desarrollo y actividad de los microorganismos y cambios fisicoquímicos que se desarrollan. En la tabla 20 y figura 16 se reportan los datos del comportamiento de la humedad durante este proceso, Inicialmente la humedad varía de 41.10 a 44.10 % y pierde rápidamente en las primeras 24 horas, luego es lento durante el resto del proceso de fermentación, hasta 35.20 a 36.10 % de humedad.



**Tabla 20:**

*Evaluación de la humedad en grano de cacao durante la fermentación*

Tiempo (Hrs)	L1	L2	LE1	LE2	E1	E2	T
0	44.10	42.75	41.98	42.75	43.35	42.51	42.95
24	36.85	35.90	36.00	36.80	37.35	36.45	36.95
48	36.10	35.32	35.55	36.34	36.70	35.95	36.45
72	35.80	35.00	35.50	35.40	36.52	35.70	36.32
96	35.70	35.00	35.40	35.40	36.50	36.15	36.20
144	35.20	35.55	35.36	35.30	36.40*	36.10*	36.10

\*: 120 horas

Fuente: Elaboración propia.

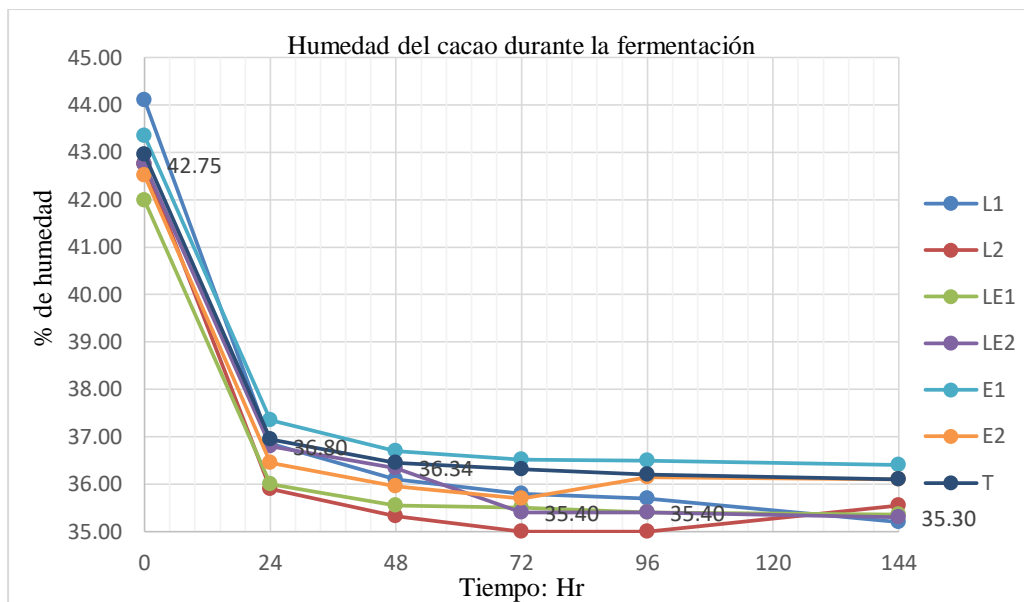


Figura 16: Tendencia del contenido de humedad en granos de cacao durante la fermentación

#### 2.4.7. Contenido de ácido acético

La evaluación del ácido acético permite conocer la actividad de las bacterias acéticas, que provoca una disminución mayor del pH que junto con el calor de la fermentación, inactivan el germen de la semilla, asimismo terminan desarrollando el color marrón del grano de cacao, por efectos de la oxidación.

**Tabla 21:**

*Evaluación del contenido de ácido acético en la fermentación*

Tiempo (Hrs)	L1	L2	LE1	LE2	E1	E2	T
0	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
12	0.12	0.11	0.12	0.12	0.50	0.50	0.11
24	0.30	0.31	0.31	0.31	1.00	1.20	0.40
36	0.50	0.80	0.90	0.80	2.00	2.40	0.90
48	1.20	1.80	2.00	1.80	2.80	3.00	2.00
60	2.00	2.50	2.80	2.50	3.50	3.70	2.80
72	3.00	2.80	3.90	3.70	5.10	6.20	3.10
84	3.80	3.90	5.20	5.00	6.20	7.10	4.00
96	5.50	5.30	8.60	8.40	8.80	9.20	5.60
108	6.30	8.10	8.90	8.60	9.50	10.10	8.20
120	7.80	10.30	9.60	9.50	10.10	11.10	10.10
132	8.90	10.90	10.20	10.00	11.40	12.10	10.60
144	10.10	11.30	10.80	10.50			11.50

Fuente: Elaboración propia

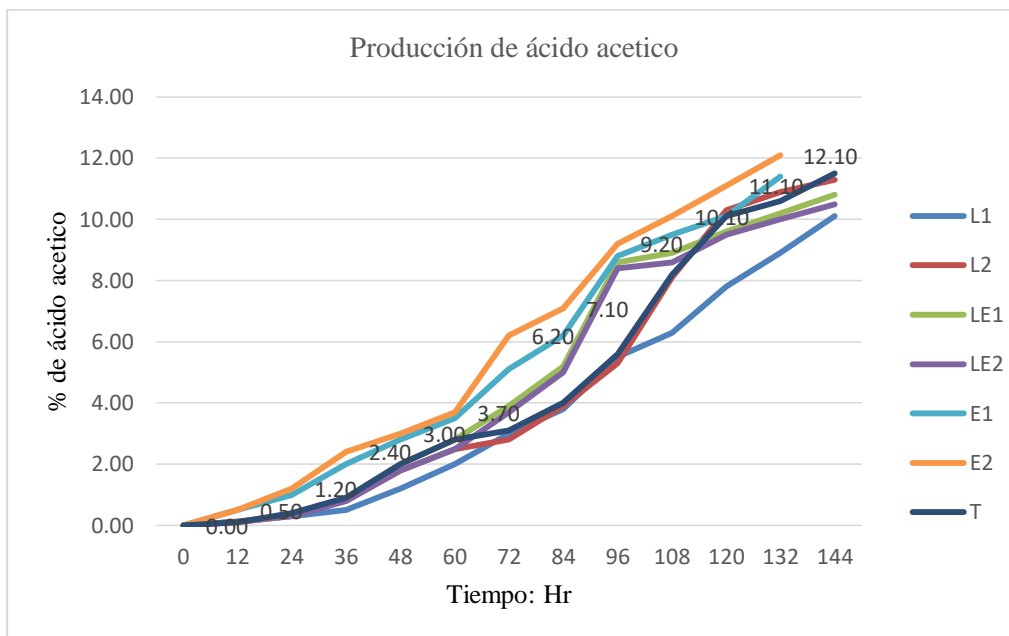


Figura 17: Tendencia del contenido de ácido acético en granos de cacao durante la fermentación

Además, los microorganismos presentes en la fermentación originan ésteres del acetato a partir de ácido acético, que darán al chocolate su peculiar sabor. La producción de ácido acético esta en relación a la cantidad de alcohol producido durante la primera parte de la fermentación. La determinación se realizó con refractómetro Pocket marca ATAGO. (Para porcentaje de ácido acético), siendo la lectura directa. En la tabla 21 y figura 17, se observa el proceso de producción de ácido acético, inicialmente es 0.0 %, llegando al final de este proceso a 12.10 % en el tratamiento E2.

### 4.3. VARIACIÓN DE CONTENIDO DE COMPUESTOS BIOACTIVOS POR PROCESO DE FERMENTACION DEL CACAO

#### 4.3.1. Capacidad antioxidante

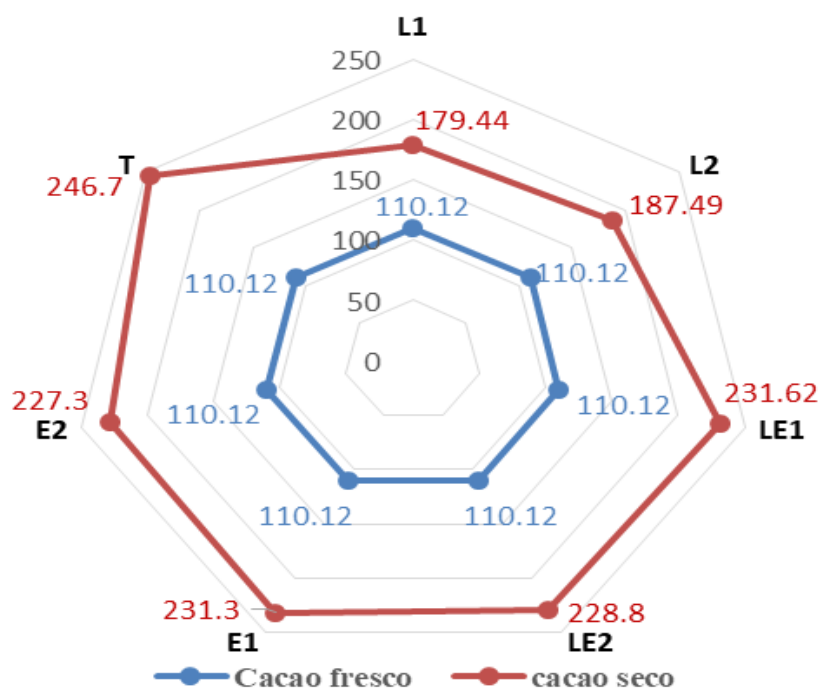
El grano de cacao es considerado rico en antioxidantes consecuentemente en polifenoles. Muchos estudios recientes, relacionan con la prevención de enfermedades relacionadas con el estrés oxidativo, como las enfermedades cardiovasculares, los procesos carcinogénicos y, las enfermedades neurodegenerativas.

**Tabla 22:**

*Variación de compuestos antioxidantes en el cacao*

Tiempo (Hras)	capacidad antioxidante (ug E trolox/mg cacao)						
	L1	L2	LE1	LE2	E1	E2	T
Cacao fresco	110.12	110.12	110.12	110.12	110.12	110.12	110.12
cacao seco	179.44	187.49	231.62	228.80	231.30	227.30	246.70

Fuente: Elaboración propio



**Figura 18:** Características de variación de capacidad antioxidante (ug E trolox/mg cacao) del cacao por efectos de la fermentación

De acuerdo a los datos reportados en la tabla 22 y graficados en la figura 18, el proceso de fermentación incrementa la capacidad antioxidante del cacao, de 110.12 ug E trolox/mg cacao fresco, a valores que varía de 179.44 (L1) a 246.70 (T) ug E trolox/mg cacao seco. Los tratamientos con adición de solamente *Saccharomyces cerevisiae*, (L1 y L2), son los que incrementan en menor cantidad la capacidad antioxidante del cacao.

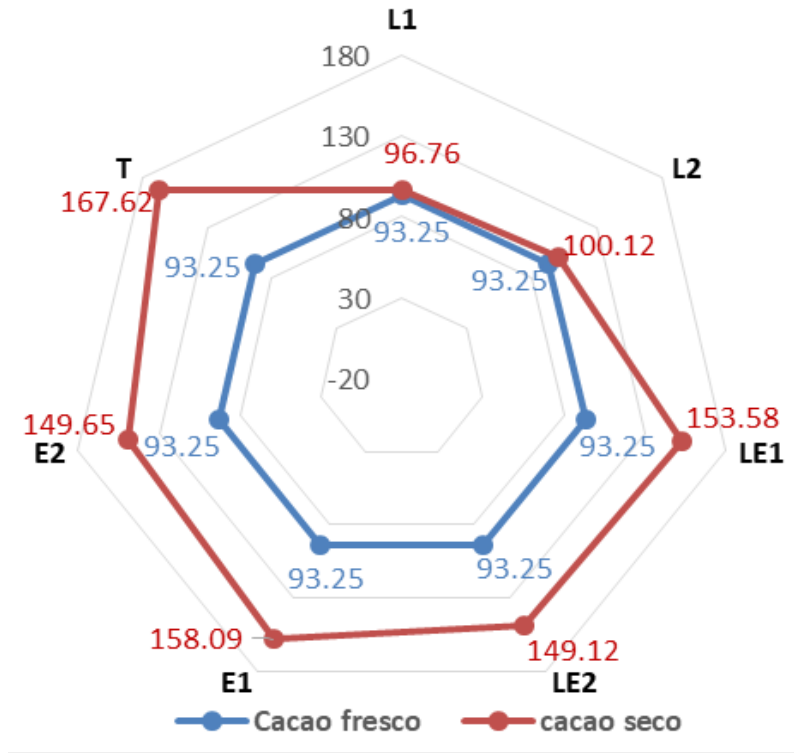
#### 4.3.2. Contenido de polifenoles totales

**Tabla 23:**

*Variación de polifenoles totales en el cacao*

Tiempo (Hrs)	Polifenoles (mg EAG/mg cacao)						
	L1	L2	LE1	LE2	E1	E2	T
Cacao fresco	93.25	93.25	93.25	93.25	93.25	93.25	93.25
cacao seco	90.76	100.12	153.58	149.12	158.09	149.65	167.62

Fuente: elaboración propia



**Figura 19:** Características de variación de contenido de polifenoles totales (mg EAG/mg cacao) del cacao por efectos de la fermentación.

El tiempo de fermentación de las almendras de cacao criollo tiene efectos en el desarrollo de los polifenoles que intervienen en el desarrollo del sabor astringente y los azúcares reductores como precursores del aroma térmico del cacao. De acuerdo a los datos hallados que se reporta en la tabla 23 y graficado en figura 19, existe un incremento ligero de polifenoles de 93.25 mg EAG/mg de cacao fresco, hasta 167.62 mg EAG/mg de cacao seco; sin embargo los tratamientos (L1 y L2) donde se adicionó *Saccharomyces cerevisiae*, prácticamente no hay incremento notándose que una población alta de levaduras al inicio de la fermentación no es beneficioso para el desarrollo de polifenoles.

#### 4.3.3. Contenido de teobromina

La teobromina es un compuesto químico alcaloide que pertenece a la familia de las metilxantinas, tiene efectos vasodilatadores y excelente relajante cardio muscular y

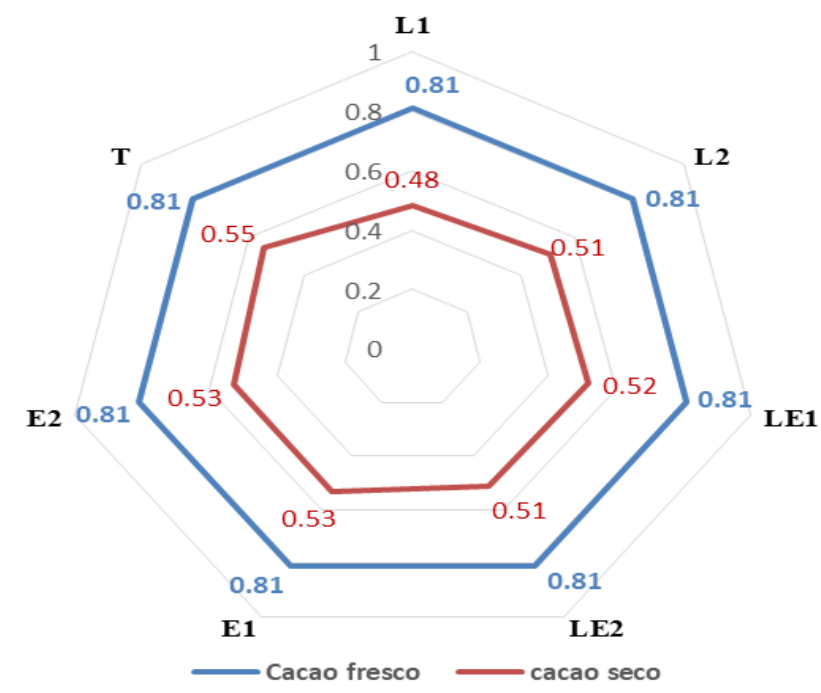
bronquial, asimismo es participe del sabor y aroma del chocolate. La determinación se realizó empleando el equipo de cromatografía líquida. Los valores hallados se reportan en la tabla 24 y figura 20. El proceso de fermentación afecta significativamente el contenido de este alcaloide, pues disminuye grandemente desde 0.81 % hasta 0.48 (L1) a 0.53 (E1 y E2) y 0.55 (T); siendo la más afectada los tratamientos con adición de levadura *Saccharomyces cerevisiae*.

**Tabla 24:**

*Variación de contenido de teobromina (%) en el cacao*

Tiempo (Hras)	Teobromina (%)						
	L1	L2	LE1	LE2	E1	E2	T
Cacao fresco	0.81	0.81	0.81	0.81	0.81	0.81	0.81
cacao seco	0.48	0.51	0.52	0.51	0.53	0.53	0.55

Fuente: elaboración propia



**Figura 20:** Características de variación de contenido de teobromina (%) del cacao por efectos de la fermentación.

#### 4.4. EVALUACION DE LA CALIDAD DEL GRANO FERMENTADO Y SECO

##### 4.4.1. Evaluación física del grano fermentado seco

###### Cuadro 25:

*Rendimientos de cotiledón y cascarilla del cacao*

Peso	L1	L2	LE1	LE2	E1	E2	T
Peso total (3granos)	3.32	3.92	3.10	3.56	3.66	3.50	4.26
Peso de cascarilla	0.57	0.67	0.45	0.52	0.61	0.53	0.63
Cotiledón (%)	82.83	82.91	85.48	85.39	83.33	84.86	85.21
Cascarilla (%)	17.17	17.09	14.52	14.61	16.67	15.14	14.79

Fuente: elaboración propia.

###### Cuadro 26:

*Rendimientos de peso promedio del cacao*

Peso	L1	L2	LE1	LE2	E1	E2	T
Peso total 100 granos (gr)	141	148	130	138	141	136	139
Peso promedio de grano (gr)	1.41	1.48	1.30	1.38	1.41	1.36	1.39

Fuente: Elaboración propia.

El rendimiento en cotiledón de cacao es parte de la calidad física, como se observa en el cuadro 25, varía de 82.83 % (L1) a 85.48 % (LE1); asimismo en la tabla 26 se tiene el peso promedio de 100 granos, que se halla de 1.30 gr (LE1) a 1,48 gr (L2); estos datos se determinaron usando la balanza analítica. El contenido de cenizas indica la cantidad de minerales presentes en el cacao; en la tabla 27 se reporta datos de % de cenizas del cacao fresco y cacao fermentado y seco, presentando un ligero descenso en todos los tratamientos de 3 a 5 % del contenido inicial, por efectos de la fermentación. La humedad menor a 8 %

permite la estabilidad del cacao durante el almacenamiento y evitar el desarrollo de mohos; todos tratamientos presentan valores de 6.90 a 7.50 %.

**Tabla 27:**

*Contenido de ceniza y humedad (%)*

<b>Característica</b>	<b>Estado</b>	<b>L1</b>	<b>L2</b>	<b>LE1</b>	<b>LE2</b>	<b>E1</b>	<b>E2</b>	<b>T</b>
Ceniza (%)	Fresco	2.291	2.210	2.312	2.199	2.335	2.373	2.305
	Seco	2.178	2.169	2.177	2.167	2.265	2.259	2.186
Humedad (%)	Seco	7.20	7.50	7.00	7.00	7.00	6.90	7.00

Fuente: Elaboración propia.

#### **4.4.2. Grado de fermentación del cacao**

La evaluación del grado de fermentación permite observar el porcentaje de granos fermentados adecuadamente y los granos con defectos como: granos pizarrosos, granos violetas, granos con moho, granos parcialmente fermentados, granos vanos y partidos, que influyen en la calidad del grano de cacao. Para evaluar adecuadamente se hizo la prueba de corte, para lo cual se empleó una guillotina de 100 granos, donde los granos de cacao son cortados por mitad simétricamente por la guillotina y permite observar las características internas de cada grano. Esta operación se realizó para cada tratamiento, cuyos datos se reportan en los cuadros del anexo 3 y figuras del 12 al 27. Para la prueba de corte se toma una muestra representativa de cada tratamiento.

De acuerdo al tiempo de fermentación, a los 3 días se va notando los cambios en la estructura del grano de cacao, sin embargo a los 4 días (96 horas), se nota claramente los cambios que se presentando en los granos, cambiando del color violeta hacia morado y luego color marrón. A los 4 días de fermentación se observa mayor cantidad de granos



pizarrosos 15% en el tratamiento L1, caso similar en el tratamiento L2, con 84 % de granos bien fermentados y un promedio de 5 a 8 % en los demás tratamientos.

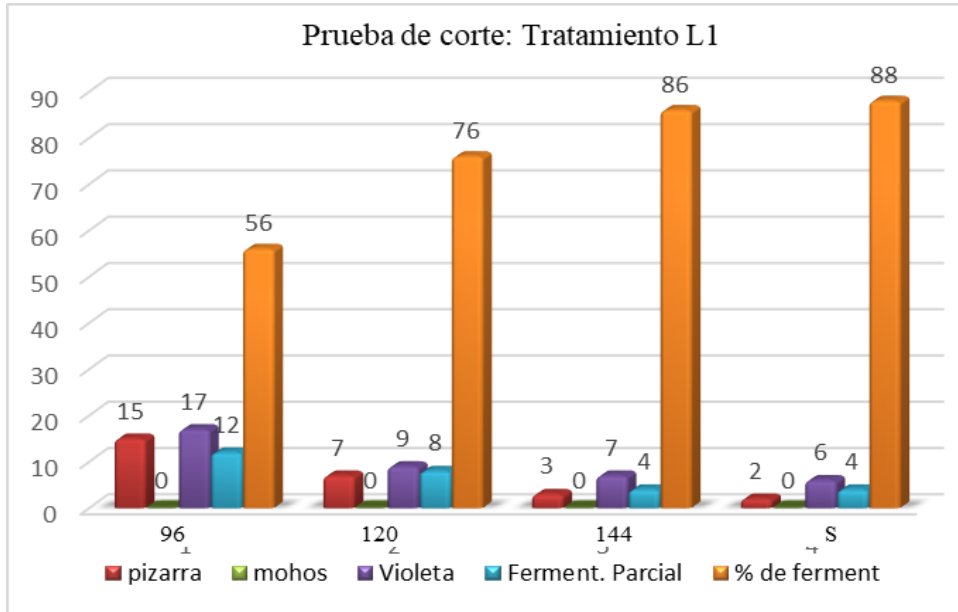


Figura 21: Grado de fermentación de tratamiento L1.

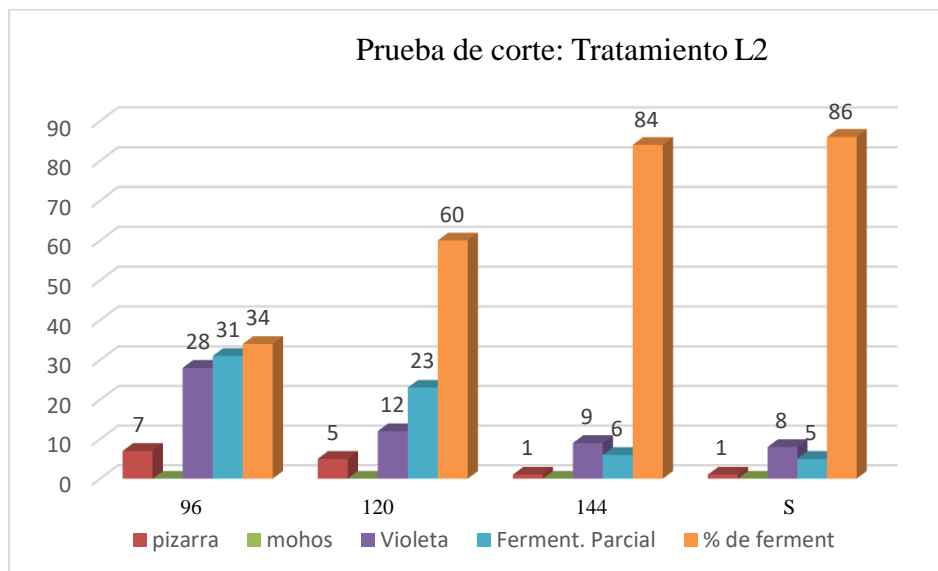


Figura 22: Grado de fermentación de tratamiento L2

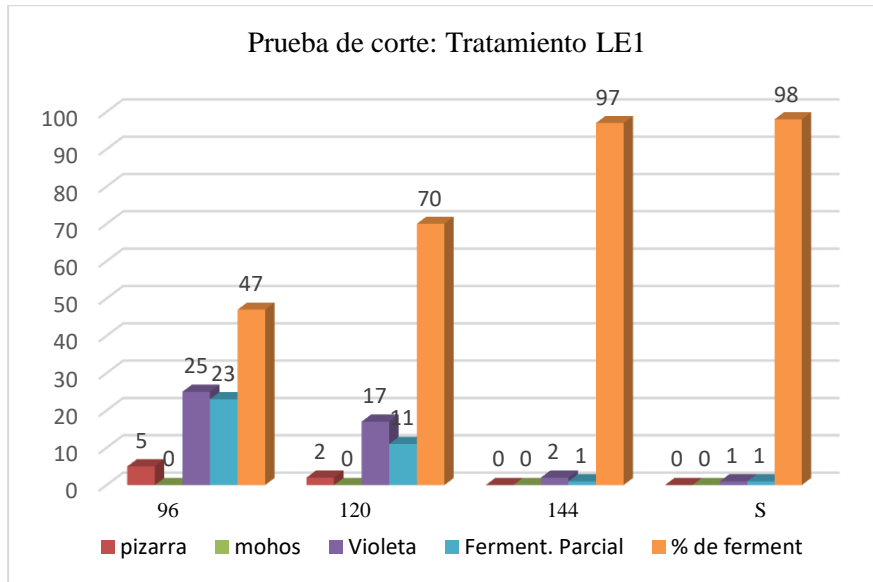


Figura 23: Grado de fermentación de tratamiento LE1

El grado de granos fermentados se incrementa de acuerdo al tiempo de fermentación y disminuye los defectos. Es interesante mencionar que en los tratamientos LE1, tienen 98% de fermentación y solamente 2 defecto; caso similar en el tratamiento LE2, como puede apreciarse en las figuras 20, 21 y 22.

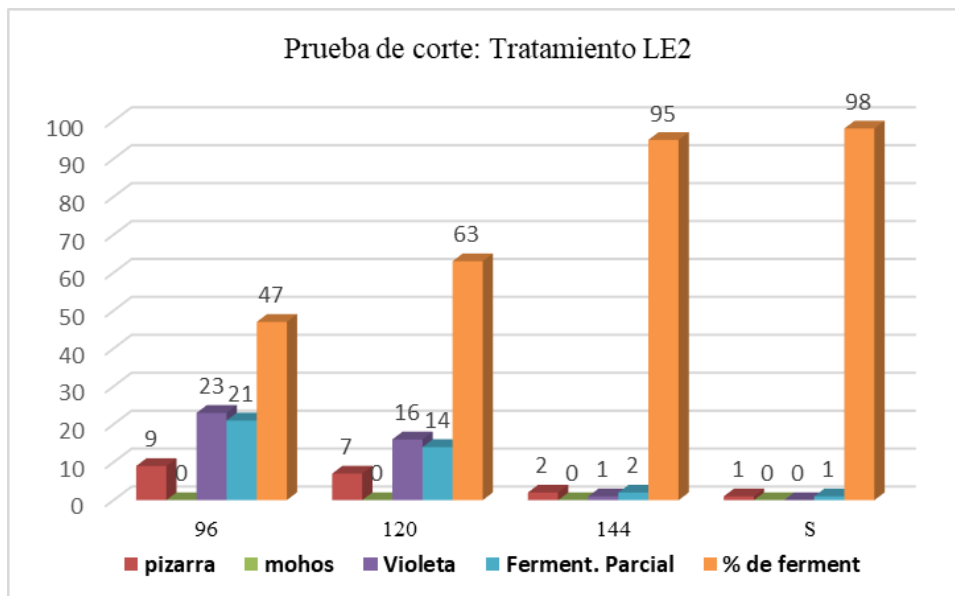


Figura 24: Grado de fermentación de tratamiento LE2

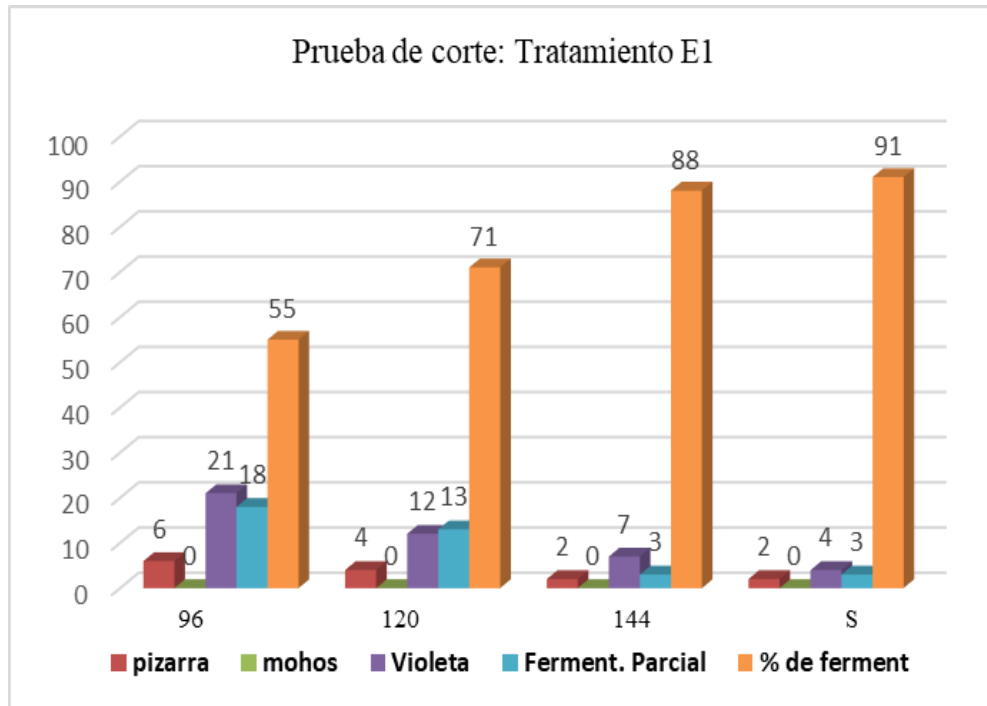


Figura 25: Grado de fermentación de tratamiento E1

El desarrollo de mohos en la evaluación visual que es subjetivo, durante la fermentación es cero, lo que indica que no hay desarrollo de aromas y sabores extraños en el cacao. Los tratamientos L1, E1, E2 y T, desarrollaron un grado de fermentación de 88, 91, 94 y 91 %, respectivamente. En todos los tratamientos las almendras están bien fermentadas fueron fáciles de reconocer porque su interior es de color marrón y son quebradizas al tacto y presentaron un color pardo marrón claro, indicador de una buena fermentación.

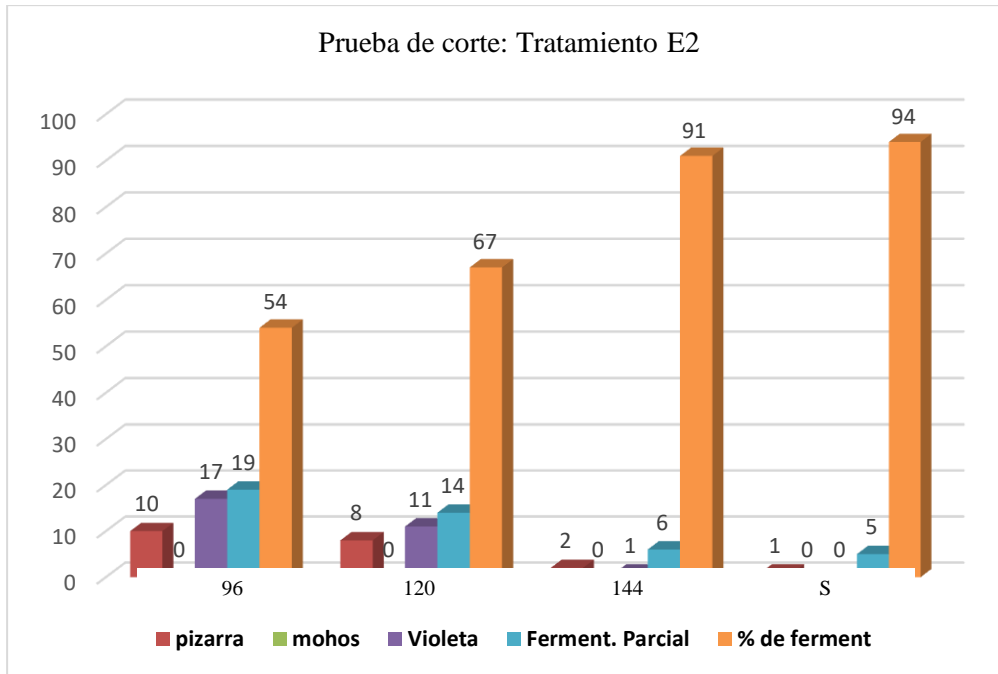


Figura 26: Grado de fermentación de tratamiento E2.

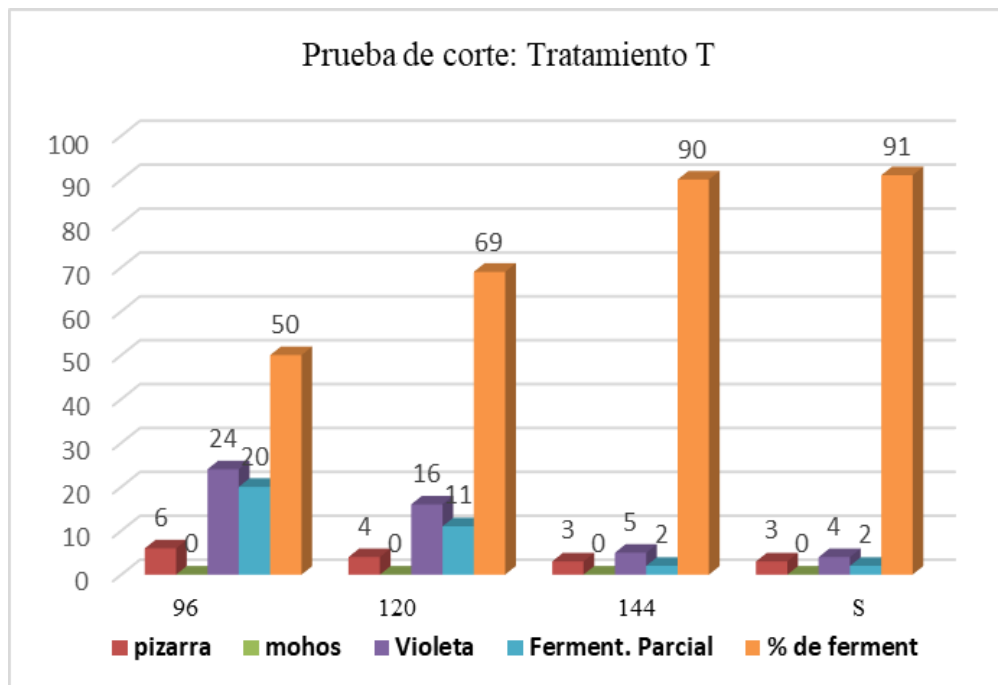


Figura 27: Grado de fermentación de tratamiento T.

**Tabla 28:***Prueba de comparaciones de Tukey de granos pizarra a una confianza de 95%*

<i>Tratamiento</i>	<i>Casos</i>	<i>Media LS</i>	<i>Agrupaciones</i>
LE1	2	0.5	A
L2	2	1.0	A
LE2	2	1.0	A
E2	2	2.0	A
T	2	2.5	A
L1	2	2.5	A
E1	2	2.5	A

ALS(t): 1.65

**Tabla 29:***Prueba de comparaciones de Tukey de granos violeta a una confianza de 95%*

<i>Tratamiento</i>	<i>Casos</i>	<i>Media LS</i>	<i>Agrupaciones</i>
LE1	2	0.0	A
E2	2	0.0	A
LE2	2	0.5	A
E1	2	3.5	B
T	2	4.0	B C
L1	2	5.5	C D
L2	2	7.0	D

ALS(t): 1.67

En los Anexo 3 y 4, se presentan los resultados completos de la evaluación de grado de fermentación, mediante la prueba de corte y procesamiento estadístico del análisis de varianza de los seis (6) tratamientos y la muestra testigo (T), para conocer el perfil de fermentación en los atributos de granos pizarrosos, granos violeta, granos parcialmente fermentado y granos bien fermentados. Para estos atributos de fermentación evaluados, se aplicó la prueba de Tukey ( $p < 0,05$ ), que se muestran en las tablas 28, 29, 30 y 31; que señala que se debe de rechazar la hipótesis nula; es decir, que existen diferencias

significativas de los atributos evaluados en los seis Tratamientos en estudio del cacao fermentado y seco.

**Tabla 30:**

*Prueba de comparaciones de Tukey de fermentación parcial a una confianza de 95%*

<i>Tratamiento</i>	<i>Casos</i>	<i>Media</i>	<i>Agrupaciones</i>
LE1	2	1.0	A
LE2	2	1.0	A
T	2	2.0	A B
E1	2	3.0	B C
L1	2	4.0	C D
L2	2	5.0	D
E2	2	5.0	D

ALS(t): 1.09

**Tabla 31:**

*Prueba de comparaciones de Tukey de % de fermentación a una confianza de 95%*

<i>Tratamiento</i>	<i>Casos</i>	<i>Media</i>	<i>Agrupaciones</i>
L2	2	97.5	A
L1	2	97.0	A
T	2	94.0	B
E1	2	91.0	C
E2	2	91.0	C
LE2	2	88.5	D
LE1	2	86.5	E

ALS(t):1.67

#### 4.4.3. Características microbiológicas de la fermentación

La presencia de microorganismos permite el desarrollo de la fermentación, sobre cierto tipo de sustratos, los principales microorganismos involucrados en la fermentación del cacao son las levaduras, bacterias lácticas y acéticas, como también los mohos, que no es beneficioso.

##### a. Levaduras

Dada la capacidad de las levaduras para producir grandes componentes bioactivos, y están involucradas en la producción del de etanol, enzimas, bioplásticos y metabolitos de bajo peso molecular, durante la fermentación del cacao fresco en baba. Mayormente tiene actividad durante la primera fase de la fermentación, principalmente anaerobia, siendo el producto principal el alcohol, que es el metabolito básico para la formación de ácido acético, que se forma en la parte final de la fermentación (tabla 32).

**Tabla 32:**

*Población de levaduras por fermentación*

Tiempo (Hrs)	Levaduras (UFC/g)						
	L1	L2	LE1	LE2	E1	E2	T
0	$6.5 \times 10^2$	$7.0 \times 10^2$	$6.0 \times 10^2$	$6.5 \times 10^2$	$5.0 \times 10^2$	$5.0 \times 10^2$	$5.0 \times 10^2$
24	$7.0 \times 10^6$	$8.0 \times 10^6$	$5.0 \times 10^6$	$5.5 \times 10^6$	$4.5 \times 10^6$	$4.8 \times 10^6$	$3.9 \times 10^6$
48	$3.0 \times 10^4$	$3.5 \times 10^4$	$3.0 \times 10^4$	$3.0 \times 10^4$	$2.0 \times 10^4$	$2.5 \times 10^4$	$2.0 \times 10^4$
72	$8.0 \times 10^3$	$9.0 \times 10^3$	$7.0 \times 10^3$	$8.0 \times 10^3$	$8.5 \times 10^3$	$7.5 \times 10^3$	$7.0 \times 10^3$
Fin de ferment	$2.0 \times 10^3$	$3.0 \times 10^3$	$2.0 \times 10^3$	$2.0 \times 10^3$	$2.0 \times 10^3$	$1.0 \times 10^3$	$1.0 \times 10^3$
Fin de secado	$1.0 \times 10^2$	$1.0 \times 10^2$	$1.0 \times 10^2$	$1.0 \times 10^2$	< 10	< 10	$1.0 \times 10^2$

Fuente: elaboración propia

Durante el tiempo de fermentación se evaluó mediante el cultivo en placas, la población de levaduras, a fin de conocer su actividad y relación con los demás parámetros. La mayor población alcanza a las 24 horas que varía de  $3.9 \times 10^6$  UFC/g (T) a  $8.0 \times 10^6$  UFC/g (L2),

notándose que hay mayor población en los tratamientos donde se adicionó cepas de levadura y menor población en el tratamiento testigo. Luego la población va disminuyendo a medida que se agota el sustrato, finalizando con cantidades de  $0.6 \times 10^3$  a  $1.0 \times 10^3$  UFC/g, siendo al menor a 10 UFC/g, en grano seco.

## b. Hongos

**Tabla 33:**

*Población de mohos por fermentación*

Tiempo (Hrs)	Hongos (UFC/g)						
	L1	L2	LE1	LE2	E1	E2	T
0	$1.0 \times 10$	$1.0 \times 10$	$1.0 \times 10$	$1.0 \times 10$	$1.0 \times 10$	$1.0 \times 10$	$1.0 \times 10$
24	$7.0 \times 10^2$	$6.0 \times 10^2$	$5.0 \times 10^2$	$5.5 \times 10^2$	$3.0 \times 10^2$	$3.0 \times 10^2$	$4.0 \times 10^2$
48	$4.0 \times 10^2$	$3.0 \times 10^2$	$3.0 \times 10^2$	$2.5 \times 10^2$	$2.0 \times 10^2$	$2.0 \times 10^2$	$2.5 \times 10^2$
72	$1.0 \times 10^2$	$1.5 \times 10^2$	$1.5 \times 10^2$	$1.5 \times 10^2$	$1.0 \times 10^2$	$1.0 \times 10^2$	$1.0 \times 10^2$
Fin de ferment	$0.8 \times 10^2$	$1.0 \times 10^2$	$1.0 \times 10^2$	$1.0 \times 10^2$	$0.8 \times 10^2$	$0.6 \times 10^2$	$0.6 \times 10^2$
Secado	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10

Fuente: elaboración propia.

Los mohos son microorganismos no deseados en la fermentación del cacao, sin embargo las cepas salvajes se hallan en el medio, los cuales son controlados por la población de levaduras y bacterias; la determinación se realizó por cultivo en placas, para conocer la población durante el proceso (tabla 33). La cantidad es bajo que no incide en la calidad de los granos de cacao fermentado. Es importante conocer la cantidad de mohos en el cacao seco, que poblaciones significativas pueden producir micotoxinas, principalmente las ocratoxinas, que no es benéfico para un grano de cacao fino; en este caso los mohos al final del secado son menores a 10 UFC/g, cuyos valores se hallan dentro de las normas de calidad y garantizan su inocuidad.



### c. Bacterias acéticas

Conocer la población de bacterias formadoras de ácido acético es importante, permite conocer el % de ácido acético que se va desarrollando. La presencia de bacterias lácticas en forma significativa son a las 24 horas, en cantidades similares que varía de  $0.1 \times 10^2$  UFC/g (L1) a  $0.3 \times 10^2$  UFC/g (E2), siendo a las 72 horas la mayor población que va de  $4.1 \times 10^5$  UFC/g (LE2) a  $7.2 \times 10^5$  UFC/g (E2), luego ir disminuyendo al final de la fermentación a valores de  $1.1 \times 10^4$  UFC/g. En grano seco se hallan valores menores a 10 UFC, garantiza la estabilidad de la calidad del cacao durante el almacenamiento (tabla 34).

**Tabla 34:**

*Población de bacterias acéticas por fermentación*

Tiempo (Hras)	Bacterias acéticas (UFC/g)						
	L1	L2	LE1	LE2	E1	E2	T
0	0	0	0	0	0	0	0
24	$0.1 \times 10^2$	$0.2 \times 10^2$	$0.2 \times 10^2$	$0.2 \times 10^2$	$0.3 \times 10^2$	$03 \times 10^2$	$0.3 \times 10^2$
48	$0.8 \times 10^3$	$0.8 \times 10^3$	$0.9 \times 10^3$	$0.9 \times 10^3$	$1.0 \times 10^3$	$1.1 \times 10^3$	$1.0 \times 10^3$
72	$4.4 \times 10^5$	$4.5 \times 10^5$	$4.2 \times 10^5$	$4.1 \times 10^5$	$6.7 \times 10^5$	$7.2 \times 10^5$	$6.6 \times 10^5$
Fin de ferment	$1.2 \times 10^4$	$1.3 \times 10^4$	$1.2 \times 10^4$	$1.1 \times 10^4$	$1.4 \times 10^4$	$1.5 \times 10^4$	$1.3 \times 10^4$
Secado	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10

Fuente: Elaboración propia.

#### 4.4.4. Calidad sensorial del cacao

En los Anexos 5, 6 y 7, se muestran los resultados completos y procesamiento estadístico de la evaluación sensorial de los seis (6) tratamientos en estudio y el tratamiento testigo fermentado naturalmente, para los atributos: olor, acidez, amargor, astringencia, sabor/aroma, limpieza, post gusto y puntaje del catador; de las muestras secas y procesadas como licor o pasta de cacao. Para estos atributos sensoriales evaluados se realizó el análisis de varianza, para establecer el grado de diferencia significativa entre tratamientos se realizó

la prueba de tukey ( $p < 0,05$ ), los resultados señala que se debe de rechazar la hipótesis nula; es decir, que existen diferencias significativas en los atributos: olor, acidez, amargor, astringencia, sabor/aroma, limpieza, post gusto y puntaje del catador, como consecuencia el puntaje total de la evaluación sensorial de cada tratamiento. En la Tabla 35, se resume los resultados de la evaluación sensorial de los seis tratamientos en estudio y el tratamiento testigo, que permite graficar el perfil sensorial de cada tratamiento empleando el grafico radial con marcadores.

**Tabla 35:**

*Características sensoriales de los tratamientos en estudio*

<b>Tratamiento/atributo</b>	<b>L1</b>	<b>L2</b>	<b>LE1</b>	<b>LE2</b>	<b>E1</b>	<b>E2</b>	<b>T</b>
Olor	7.00	7.67	6.33	7.33	8.33	8.67	8.00
Acidez	7.00	7.67	7.00	7.33	8.33	8.67	7.67
Amargor	7.33	7.00	7.33	7.33	8.67	9.00	8.00
Astringencia	6.33	6.67	7.33	7.33	8.00	8.33	8.33
Sabor/aroma	12.67	15.33	14.00	14.67	16.67	18.00	16.67
Limpieza	10.00	10.00	8.33	10.00	10.00	10.00	10.00
Post gusto	7.33	7.33	6.67	8.00	9.00	9.00	8.33
Puntaje catador	7.00	7.33	7.00	8.00	8.33	8.67	8.67
<b>Total</b>	<b>64.67</b>	<b>69.00</b>	<b>64.00</b>	<b>70.00</b>	<b>77.33</b>	<b>80.33</b>	<b>75.67</b>

Fuente: elaboración propia

El tratamiento testigo T (fermentación natural sin ningún aditivo), tiene un puntaje total de 75.67, el tratamiento L1: 64.67, L2: 69.00, LE1: 64.00, LE2: 70.00, E1: 77.33 y E2: 80.33; los tratamientos E1, E2 y T, poseen puntajes superiores a 71 puntos y son considerados como cacao especial, e acuerdo a los requerimientos exigidos por APPCACAO, el tratamiento E2 supera los 80 puntos que clasifica como cacao especial fino. Los tratamientos L1, L2, LE1 y LE2; superan el puntaje de 51 puntos por lo que son

considerados como cacao de calidad, sin embargo aquí se nota que la incorporación de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* al inicio de la fermentación, afecta la calidad del producto final, puesto que tienen puntajes menores que el tratamiento testigo.

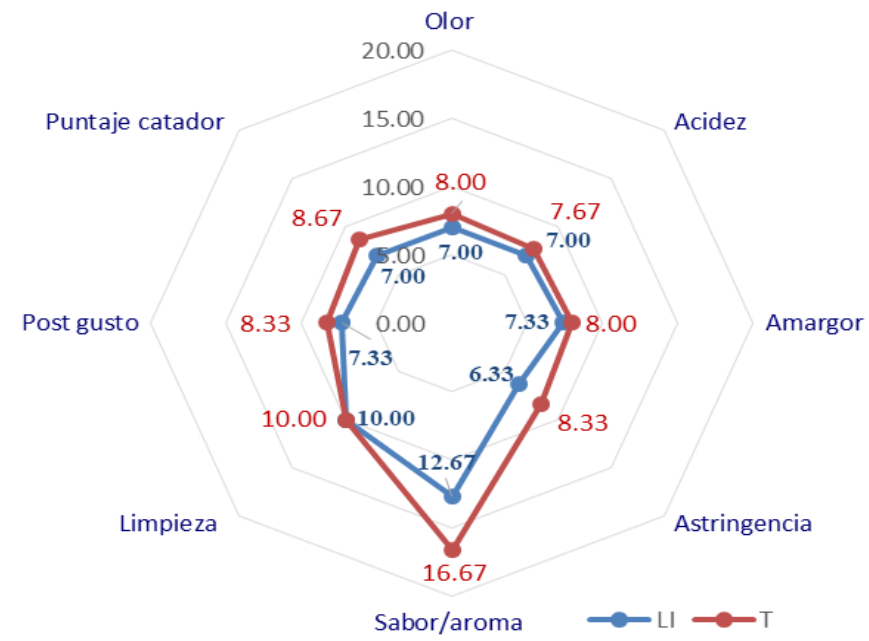


Figura 28: Atributo sensorial del Tratamiento L1

La figura 28, grafica el atributo sensorial total del tratamiento L1 frente al tratamiento testigo (T), muestra que posee atributos menores que el testigo, principalmente en sabor/aroma y astringencia; en la figura 29, se aprecia la comparación sensorial del tratamiento L2 con el tratamiento testigo y se aprecia una pequeña diferencia favorable del testigo, principalmente en la astringencia; la figura 30, muestra que el tratamiento testigo (T), supera en cualidades sensoriales al tratamiento LE1 (0.05 % Lev. + 0.07 ml enz.), en todos los atributos; igualmente en la figura 31 se observa que el tratamiento LE2 (0.1 % Lev + 0.14 ml enz.), posee cualidades sensoriales menores que el testigo. La figura 32 muestra que el tratamiento E1 (0.07 ml enz.), posee mejores atributos sensoriales que el tratamiento testigo; sin embargo la figura 33, destaca que el tratamiento E2 (0.14 ml enz.), tiene mejores cualidades sensoriales que es testigo, cuyas

cualidades lo califica como cacao especial fino. La incorporación de enzimas pectolíticas en la fermentación del cacao, beneficia en el desarrollo de mejores atributos sensoriales en el producto seco.

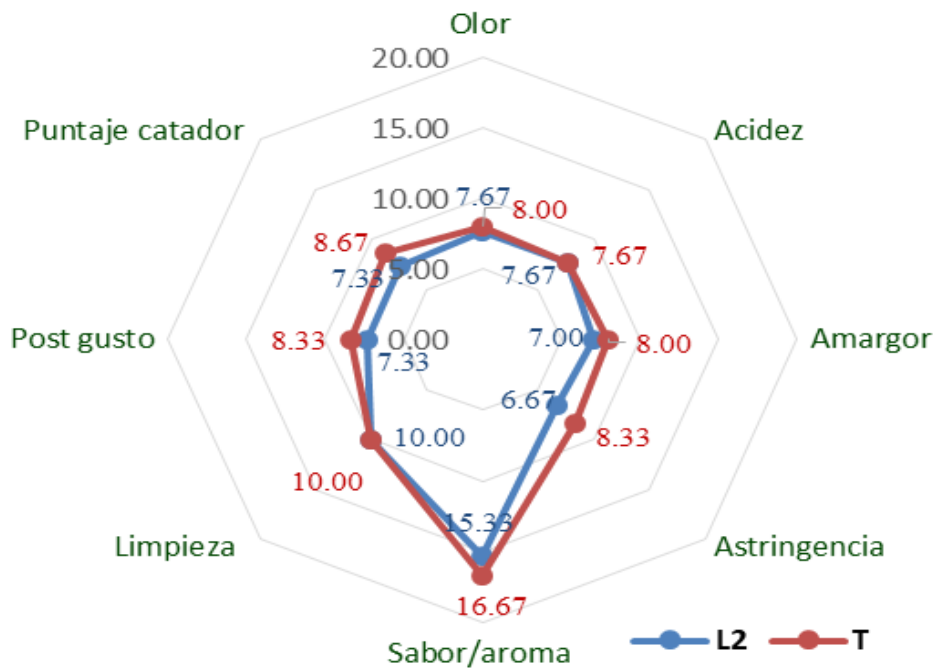


Figura 29: Atributo sensorial del Tratamiento L2

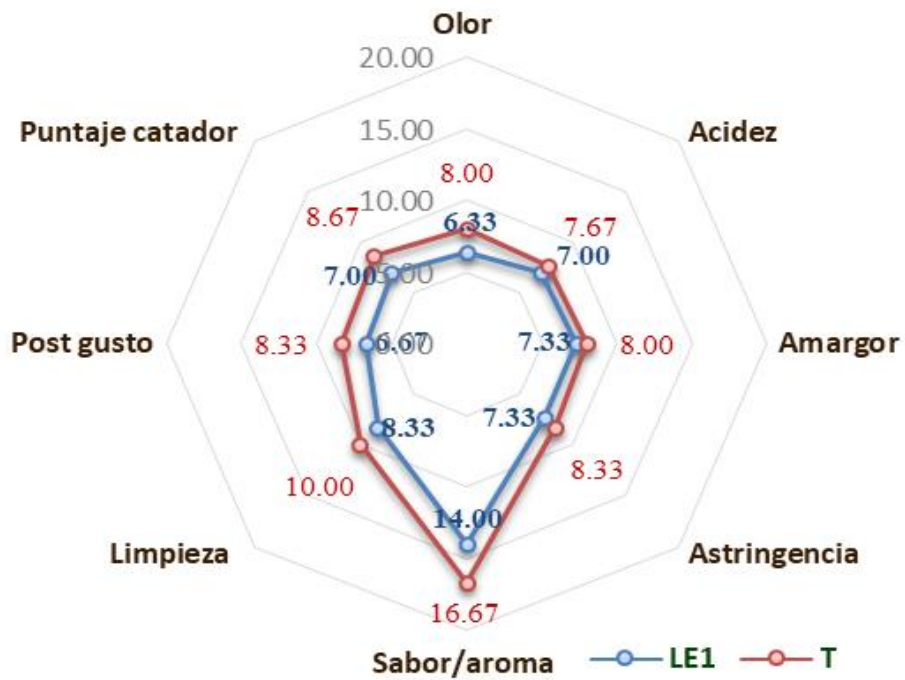


Figura 30: Atributo sensorial del Tratamiento LE1

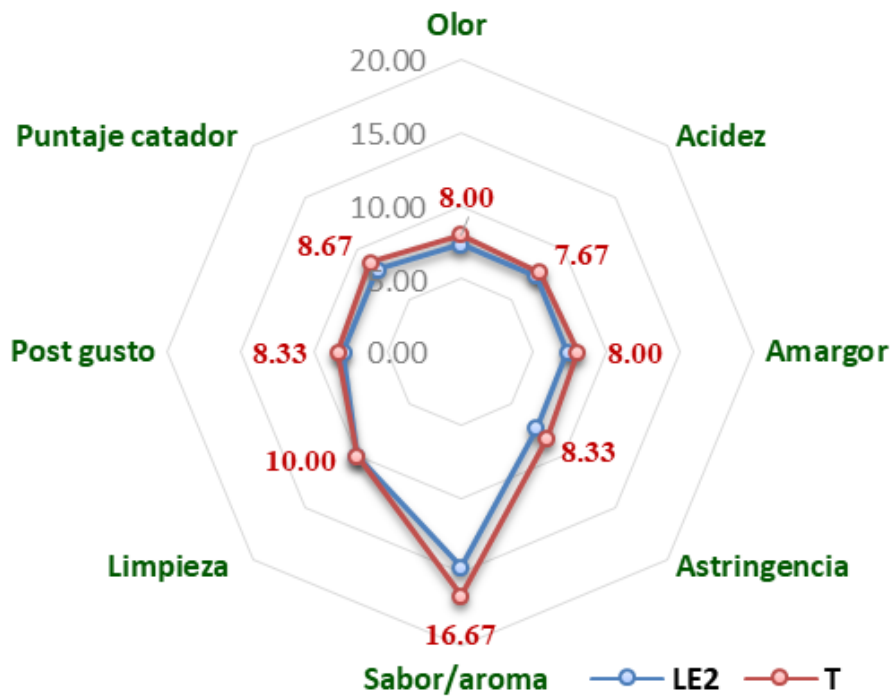


Figura 31: Atributo sensorial del Tratamiento LE2

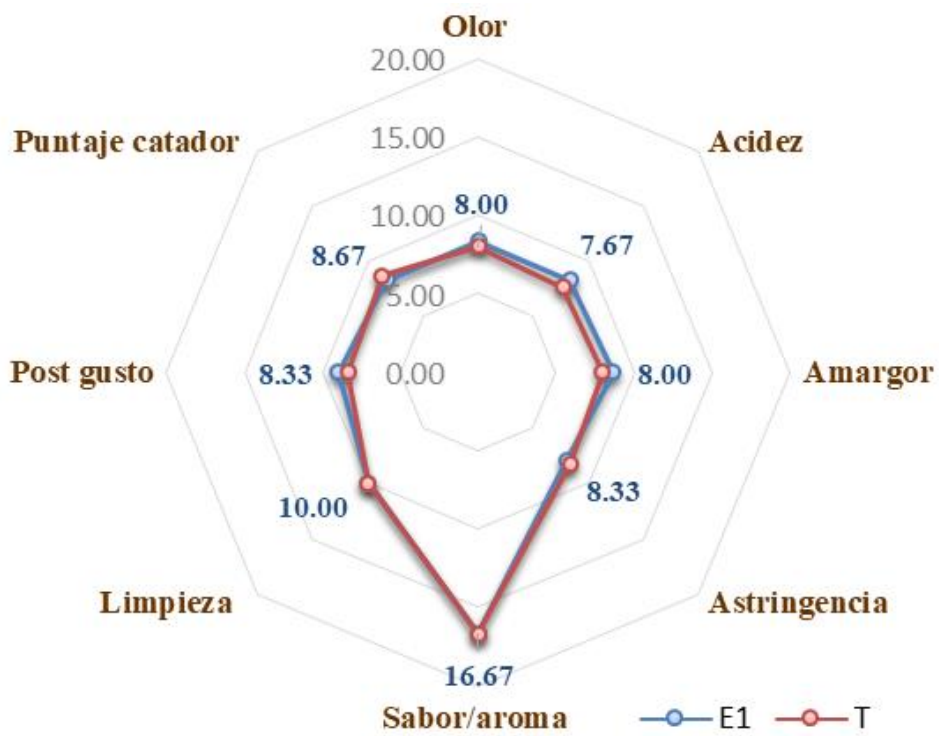


Figura 32: Atributo sensorial del Tratamiento E1

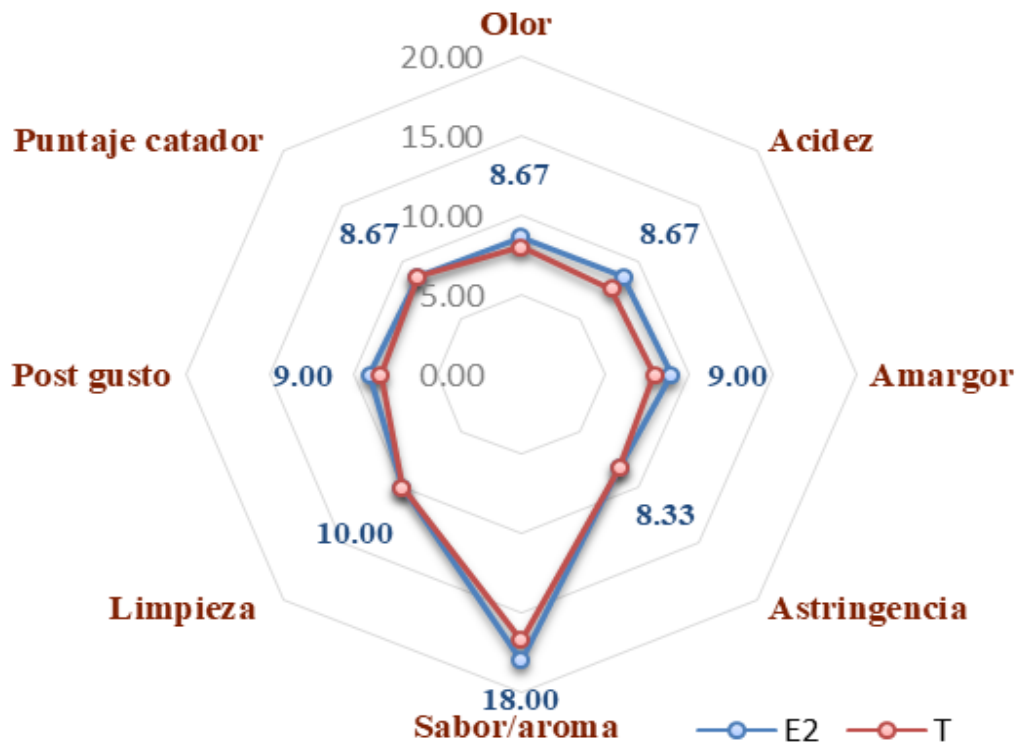


Figura 33: Atributo sensorial del Tratamiento E2

En el anexo 7 se reporta los datos de la evaluación sensorial estadísticamente, mediante el análisis de varianza, donde existe diferencia significativa a nivel de tratamientos, por lo que se presentan los resultados de la prueba de Tukey ( $p < 0,05$ ), para los atributos olor/fragancia, acidez, amargor, astringencia, sabor/aroma, limpieza, post gusto y puntaje del catador, que se reportan en las tablas 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42 y 43; de esta forma se conoció el mejor tratamiento y las diferencias significativas que se establecen entre tratamientos y conocer que tratamientos serían los recomendados para mejorar la calidad del cacao criollo durante el proceso de fermentación y comprobar las hipótesis planteadas.

En la Tabla 36, se aprecia el resultado de la prueba de Tukey, estableciendo el ordenamiento de medias y las diferencias de estas para el atributo olor/fragancia, considerando la ALS(t):

0.285218, notándose que el mejor tratamiento es E2, estableciendo diferencia significativa, respecto a los tratamientos LE2 y L1, mas no respecto a los tratamientos E1, T, L2 y LE1.

**Tabla 36:**

*Prueba de Comparaciones de Tukey de Olor/fragancia, confianza de 95%*

Tratamientos	N	Media LS	Agrupación
E2	3	8.66667	a
E1	3	8.00000	a b
T	3	8.00000	a b
L2	3	7.66667	a b
LE1	3	7.16667	a b
LE2	3	7.16667	b
LI	3	7.00000	b

$ALS(t):0.285218$

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

Respecto al atributo de acidez, la prueba de Tukey reportado en la tabla 37, indica que el mejor tratamiento es E2, constituyendo diferencia significativa respecto a los tratamientos LE1, L1 y LE2, mas no así en relación a los tratamientos E1, T y L2.

**Tabla 37:**

*Prueba de comparaciones de Tukey de acidez a una confianza de 95%*

Tratamientos	N	Media LS	Agrupación
E2	3	8.66667	a
E1	3	8.00000	a b
T	3	8.00000	a b
L2	3	7.66667	a b
LE1	2	7.12821	b
L1	3	7.00000	b
LE2	4	6.93590	b

$ALS(t):0.269819$

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

**Tabla 38:***Prueba de comparaciones de Tukey de **amargor** a una confianza de 95%*

<b>Tratamientos</b>	<b>N</b>	<b>Media LS</b>	<b>Agrupación</b>
E2	3	9.00000	a
E1	3	8.66667	a
T	3	8.00000	a b
LE2	3	7.46154	b
L1	3	7.33333	b
LE1	3	7.07692	b
L2	3	7.00000	b

*ALS(t): 0.224651*

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

La prueba de tukey para amargor, se aprecia en la tabla 38, donde los tratamientos E2 y E1, poseen mejores características y son diferentes estadísticamente respecto de los tratamientos LE2, L1, LE1 y L2, mas no del tratamiento testigo (T). Respecto al atributo astringencia, la prueba de Tukey que se muestra en la tabla 39, indica, que los tratamientos E2 y testigo (T), poseen características iguales, estableciendo diferencia significativa en relación a los tratamientos L2 y L1, no obstante no existe diferencia significativa respecto a los tratamientos E1, LE1 y LE2.

**Tabla 39:***Prueba de comparaciones de Tukey de **astringencia**, a una confianza de 95%*

<b>Tratamientos</b>	<b>N</b>	<b>Media LS</b>	<b>Agrupación</b>
E2	3	8.33333	a
T	3	8.33333	a
E1	3	8.00000	a b
LE1	3	7.33333	a b c
LE2	3	7.33333	a b c
L2	3	6.66667	b c
L1	3	6.33333	c

*ALS(t): 0.297442*



La tabla 40, muestra los resultados de la prueba de Tukey para sabor/aroma, los tratamientos E1 y E2, tienen mejor atributo, no hay diferencia significativa respecto al tratamiento testigo (T) y existe diferencia significativa respecto a los tratamientos L2, LE2, LE1 y L1.

Asimismo el atributo limpieza, según la prueba de Tukey, es el óptimo para todos los tratamientos excepto el tratamiento LE1, como se aprecia en la tabla 41, no existe diferencia entre tratamientos. La prueba de Tukey para el atributo post gusto (tabla 42) indica que los tratamientos E1 y E2 poseen mejor calificación y no existe diferencia significativa respecto a los tratamientos testigo (T) y LE2, si hay diferencia estadística para los tratamientos L1, L2 y LE1; esta característica es importante, puesto que es la sensación que queda en la boca luego de la degustación del cacao. Es importante esta característica, pues es la sensación de satisfacción que siente el catador al final de la degustación.

**Tabla 40:**

*Prueba de comparaciones de Tukey de **sabor/aroma**, a una confianza de 95%*

<b>Tratamientos</b>	<b>N</b>	<b>Media LS</b>	<b>Agrupación</b>
E1	3	18.0000	a
E2	3	18.0000	a
T	3	16.6667	a b
L2	3	15.3333	b c
LE2	3	14.6667	b c d
LE1	3	14.0000	c d
L1	3	12.6667	d

*ALS(t): 0.544892*

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

**Tabla 41:***Prueba de comparaciones de Tukey de limpieza, a una confianza de 95%*

Tratamientos	N	Media LS	Agrupación
E1	3	10.00	a
E2	3	10.00	a
T	3	10.00	a
L1	3	10.00	a
L2	3	10.00	a
LE2	3	10.00	a
LE1	3	8.33	b

 $ALS(t): 0.29804$ 

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

**Tabla 42:***Prueba de comparaciones de Tukey de post gusto, a una confianza de 95%*

Tratamientos	N	Media LS	Agrupación
E1	3	9.00000	a
E2	3	9.00000	a
T	3	8.33333	a b
LE2	3	8.00000	a b
L1	3	7.33333	b c
L2	3	7.33333	b c
LE1	3	6.66667	c

 $ALS(t): 0.294434$ 

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

En la tabla 43, se tiene la prueba de Tukey para puntaje del catador, apreciándose que los tratamientos E2 y el testigo (T), poseen mejores cualidades, no hay diferencia significativa respecto a los tratamientos E1 y LE2, si existe diferencia respecto a los demás tratamientos.

**Tabla 43:** Prueba de comparaciones de Tukey de **puntaje de catador**, a una confianza de 95%

Tratamientos	N	Media LS	Agrupación
E2	3	8.66667	a
T	3	8.66667	a
E1	3	8.33333	a b
LE2	3	8.00000	a b
L2	3	7.33333	b c
L1	3	7.00000	c
LE1	3	7.00000	c

$ALS(t)$ : 0.302193

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

## **CAPITULO V**

### **DISCUSION**

#### **5.1. CARACTERIZACION DEL CACAO**

En la tabla 11, se muestran los resultados de las características físicas del cacao fresco, los tamaños de las mazorcas del cacao criollo son medianos, de color amarillo a marrón y guindo en algunos casos, el peso promedio de 792.00 g, que es superior a 771.00 g, reportado por Palomino y Aquino (2017), el largo promedio determinado en la investigación es 22.83 cm, ancho 10.00 cm, número de granos por mazorca 42; Palomino y Aquino (2017), determinaron el largo de la mazorca 17,7 cm, ancho 9.4 cm y número de granos de 37 a 39 unidades; Lucia (2002), menciona las características físicas del cacao criollo, presentan de largo 17 cm, ancho 7.8 cm y número de granos de 35 a 45 unidades por mazorca; asimismo. Bravo y Mingo (2001), hallaron mazorcas de 17.1 a 25.4 cm de largo, de 8.7 a 11.4 cm de ancho, de 36 a 46 granos por mazorca. MINAG (2003), los frutos de cacao son de tamaño, color y formas variables, pero generalmente tienen forma de baya, de 30 cm de largo y 10 cm de diámetro, de 32 a 48 granos por fruto, siendo lisos o acostillados, de forma elíptica y de color rojo, amarillo, morado o café. Plua (2008), menciona que el cacao criollo o nativo presenta mazorcas de tamaño mediano, alargadas con la punta aguda recta o curvada, con cáscara poca rugosa con 10 surcos. Se caracterizan por tener semillas grandes blancas o ligeramente pigmentadas, cilíndricas u ovales y aromáticas, se considera de alta calidad por ser muy agradables.

El largo de las semillas de cacao fresco varía de 2.70 cm a 3.00 cm, ancho de 1.57 a 1.70 cm. El espesor de 0.70 a 0.80, color de la pulpa blanco y color de cotiledón de lila a morado, estas características son similares a lo determinado por: Palomino y Aquino (2017) largo de la semilla de 2.5 a 3.0 cm, ancho 1.5 a 1.9 cm, espesor de 0.5 a 0.9 cm, pulpa blanquisino y

almendra color morado. Bravo y Mingo (2001), determinó largo de 2.4 a 3.0 cm, ancho 1.5 a 2.0 cm, pulpa blanca y cotiledón morado. Martínez (2016), halló el largo del grano de cacao 2.5 a 3.2 cm, ancho 1.7 a 2.0 cm y pulpa blanca.

En la tabla 12, se muestran los resultados de las características físicoquímicas de las semillas frescas del cacao sólidos solubles del mucílago de 17 a 17.20 °Brix; pH: de grano de 7.40 a 7.57, del mucílago de 4.50 a 4.60, acidez del mucilago de 0.70 a 0.80 % de ácido cítrico, humedad de 41.13 a 44.14 %; índice de madurez de 21.25 a 22.57; estos datos se hallan dentro del rango determinado por Palomino y Aquino (2017), sólidos solubles del mucilago de 14.2 a 18.3 ° brix, pH del mucílago de 4.4 a 4.5, acidez de 0.70 a 0.80 % de ácido cítrico, humedad 44.4 e índice de madures de 15.29 a 21.3. Lucia (2003), halló sólidos solubles en mucílago de 16 a 17.5 °Brix, pH: de grano 6.39, de mucílago 4.40 y acidez 0,61 % de ácido cítrico. Loayza (2014), determinó sólidos solubles 16.4, pH de mucílago de 3.9 a 4.5, acidez de 0.65 a 0.70 % de ácido cítrico. Asimismo Vélchez (2016), reporta sólidos solubles 18.77 °Brix, pH 3.70 y acidez 0.90 % de ácido cítrico. Estas características del grano son importantes para el desarrollo adecuado de la fermentación, especialmente para la actividad metabólica de los microorganismos (levaduras y bacterias) y formar el perfil sensorial del cacao para chocolate; esto demuestra que la materia prima usado en esta investigación fue de buena calidad física y físicoquímica, (Portillo *et al.*, 2007)

## **5.2. CARACTERISTICAS FISICOQUIMICAS DURANTE PROCESO DE FERMENTACION DEL CACAO.**

### **5.2.1. Temperatura de fermentación**

Un factor importante para una buena fermentación es la temperatura climática, que en La Merced, Chanchamayo varió de 25 a 32 °C. En la tabla 13 y figura 9, se tiene el reporte y

grafico de la temperatura durante la fermentación, se aprecia que en todos tratamientos se incrementa con el transcurso del tiempo y siendo superior al del ambiente después del primer día, iniciándose la fermentación anaeróbica. Al primer día la temperatura varía de 26.6 °C (E2) a 28.0 °C (LE1); al término del segundo día el tratamiento L1 alcanza 31.5 °C, y la menor temperatura corresponde al tratamiento LE2, 29.8 °C; el incremento de temperatura es lento y constante, al tercer día la mayor temperatura desarrolla el tratamiento E2: 39.8 °C, seguido del tratamiento LE2: 37.5 °C y el tratamiento testigo T: 32.0 °C; sin embargo al cuarto día todos los tratamientos superan los 41 °C, siendo el mayor el tratamiento L1: 45.3 °C, seguido de los tratamientos L2 y LE1: 43.6 °C y el tratamiento testigo T: 41.7; La mayor temperatura de fermentación se logra a las 108 horas (4 días y medio), que permite la muerte del embrión del cacao, siendo las temperaturas de los tratamientos (L1: 45.7, L2: 45.4, LE1: 46.1, LE2: 45.1, E1: 47.3, E2: 48.1) °C y tratamiento testigo T a las 120 horas 48 °C; Posteriormente la temperatura de fermentación baja hasta estabilizarse y culminar a las 132 horas los tratamientos E2: 35.1 °C y E1: 35.5 °C, Los demás tratamientos culminan la fermentación en cajón a los seis días (144 horas) a temperaturas que varían de 37.7 a 40.9 °C. Esta tendencia de la temperatura de fermentación es similar a lo determinado por varios autores y difiere de otros; asimismo la remoción cada 24 horas a partir de las 48 horas permite regular el incremento de temperatura, permitiendo el desarrollo de la fermentación aerobia.

Los datos hallados difieren en la tendencia de temperatura con lo hallado por Palomino y Aquino (2017), iniciando el proceso de fermentación a 25.1 °C, al 1° día 25.48 °C, al 2° día 34.29 °C, al 3° día 39.60 °C, alcanzando 48.0 °C al sexto día, similar característica presenta los reportes de Loayza (2014), iniciando la fermentación a 27 °C y alcanzando 48.1 °C a los 150 horas. Portillo A (2012), reporta temperatura inicial de fermentación 30 °C y alcanza

50.4 °C a las 96 horas, este valor es superior y menor tiempo a lo determinado en este estudio. Asimismo García (2000), menciona que es importante la elevación de temperatura se produce aproximadamente de las 48 horas, debido a la acción de bacterias acéticas que transforman el alcohol en ácido acético, provocando una reacción exotérmica, mientras que el descenso es ocasionado por la inactivación de la microflora predominante, cuando la temperatura empieza a alcanzar valores cercanos a 45 °C.

Vílchez (2011), afirma que aumento de la temperatura ocasiona la muerte del embrión y una lisis parcial de las paredes celulares, lo que permite el contacto de las diferentes enzimas con sus respectivos substratos, ocasionando las reacciones que originan los precursores del sabor a chocolate. Navia y Pazmiño (2012), dice que la remoción de la masa es de extrema importancia en la uniformización de la temperatura de fermentación, y por el contacto con el oxígeno del ambiente favorecerá al desenvolvimiento de las bacterias acéticas. Como también la temperatura generada en la masa de fermentación está relacionada con la temperatura del ambiente (Sánchez, 2007). La temperatura óptima que alcanza en la fermentación es de 45°C a 50°C en donde ocurre el cambio bioquímico interno de la semilla, el cambio de color violeta a marrón claro y disminuye el sabor amargo y desarrolla el sabor precursor del chocolate, en el tiempo de 4 a 6 días. Martínez (2012), afirma que la rápida elevación de la temperatura favorece el proceso de fermentación al acelerar la descomposición de las células de los cotiledones, debido a su efecto sobre la viabilidad de los granos.

Las diferencias halladas en el comportamiento de fermentación con los demás estudios se deben a la calidad del cacao cosechado, edad de las plantas de cacao, al tipo de cacao, temperatura del ambiente, tipo de fermentación, cantidad de masa fermentada y condiciones de fermentación. El tratamiento E2, seguido de E1 desarrolla mejor perfil de temperatura, en relación al tratamiento testigo.

### 5.2.2. pH durante de la fermentación

Se tiene los resultados de la tendencia del pH, durante la fermentación, en la tabla 14 y figura 10, siendo al inicio un pH de 4.5, sufriendo un descenso a las 24 horas hasta pH 3.5 en los tratamientos L2 y LE2, luego se incrementa el pH en todos los tratamientos, alcanzar un pH de 5.0 en los tratamientos L1, L2, LE1, E1 y E2, mientras en el tratamiento LE2 el pH es 5.2 y para el testigo 5.1, a las 48 horas, luego decrece hasta estabilizarse en pH 4.5 a las 132 horas al igual que el mucílago. Al respecto estos valores corresponden a una fermentación normal y similar a otros estudios. Sin embargo, Palomino y Aquino (2017), determinaron que la tendencia del pH es descendente de pH 4.49 hasta 3.36 en el lapso de 144 horas; Vílchez (2016), coincide con la tendencia determinada en la investigación, menciona que inicia la fermentación con pH de 4.67 para el mucílago, que desciende a 4.31 a las 24 horas, luego termina el proceso con un pH de 4.74. El cambio del pH, hacia el descenso inicial y luego el incremento a valores superiores de pH a 4.5 se debe al contenido de ácido cítrico, presente al inicio en el mucílago, hace que el pH del mucílago y cotiledón presenten diferencias significativas Meyer *et al.* (1989). Durante la fermentación y sobre todo por efecto de la remoción, el pH se incrementa cuando el ácido cítrico se degrada por acción de microorganismos. En esta etapa, el ácido acético formado migra hacia el cotiledón, descienda su pH y luego se incrementa debido a las reacciones entre ácido acético y las diversas fracciones de proteínas (García, 2000). Portillo *et al.*, (2007), menciona que los valores bajos de  $\text{pH} \leq 4,5$  en los cotiledones disminuyen el potencial aromático en el cacao, en tanto que valores alrededor de 5,0 - 5,5 indican a un incremento del potencial del aroma, por lo que remociones de 24 horas favorecen el incremento del pH. Una acidez excesiva reduce el potencial del sabor (Biehl *et al.*, 1989).



El pH del cotiledón que se presenta en la tabla 15 y figura 11, el pH al inicio es 7.5, ligeramente alcalino, que a medida que transcurre el tiempo esta disminuye sostenidamente hasta llegar a un valor de pH de 4.5 y 4.6 para el tratamiento testigo, al final de la fermentación igualando el valor de pH con el de mucilago. Vílchez (2011), expresa que el fenómeno o cambios bioquímicos que ocurre durante la fermentación del cacao y el cambio de pH y acidez lo explica Riera (2009), indica que todo ocurre después de permanecer 48 horas en fermentación el cacao será remontado para iniciar la siguiente fermentación aerobia de vinagre y ácido láctico que desintegra el alcohol y el resto de azúcar. El ácido acético penetra en las semillas y al tercer día de fermentación el coeficiente pH de los cotiledones se reduce de 6,8 a 4,8. Asimismo Loayza (2012), establece que durante la fermentación el pH del cotiledón vario de 6.5 hasta 4.7, en 150 días. Riera (2009), obtuvo un pH que disminuye desde de 7.5, hasta 4.8, asimismo, dicho autor señala que en una fermentación normal el pH del mucilago debería subir desde el 3er y 4to día hasta alcanzar el valor de 4.5 en el cotiledón y el mucilago. Romero (2016), obtuvo un pH de 7,03 para cacao fresco y 4,84 para fermentado seco. Ortiz *et al.*, (2004) en su investigación obtuvo pH 4,85, estas variaciones de pH se producen principalmente en la etapa fermentación donde ocurren cambios principalmente por el aumento de la temperatura y la acción de los microorganismos presentes en esta etapa. Los datos obtenidos guardan correlación con los reportes de las diversas investigaciones, puesto que el pH final del cacao en todos los tratamientos está igual o superior a pH 4.5, que garantiza un buen perfil sensorial.

### **5.2.3. Acidez titulable en la fermentación**

En la tabla 16 y figura 12, se tiene los datos de acidez titulable para el mucilago del cacao, el proceso de fermentación inicia con una acidez de 1.28 % de ácido cítrico, en todos los tratamientos existe disminución hasta los 72 horas, a cifras de 0.51 % para los tratamientos

L2 y LE1, los tratamientos L1, LE2, E1, E2 y T, bajaron a acidez de 0.58, 0.64, 0.90, 0.77 y 0.54 respectivamente, luego esta acidez se incrementa hasta valores de 0.51 a 0.77 % de ácido cítrico. Ocurre lo contrario en la acidez del cotiledón, como se aprecia en la tabla 17 y figura 13, el cotiledón posee una acidez de 0.29 % de ácido cítrico al inicio de la fermentación, conforme transcurre el tiempo de fermentación, también se incrementa, estos valores sostenidamente hasta igualarse con la acidez del mucilago que es L1: 0.70, L2: 0.70, LE1: 0.77, LE2: 0.51, E1: 0.70, E2: 0.64 y T: 0.64 % de ácido cítrico. Palomino y Aquino (2017), expresan que la acidez y el pH son parámetros críticos en la calidad del cacao usado por la industria chocolatera, que al inicio el mucílago posee una acidez de 0.95 % de ácido cítrico, luego desciende al tercer día a valores de 0.2 %, para luego crecer hasta 0.61 % de ácido cítrico. Bermúdez y Mendoza (2016), afirman que en la etapa de fermentación, los ácidos láctico y acético producto de la degradación microbiana de la pulpa y son difundidos hacia el interior del cotiledón incrementado de esta manera los niveles de acidez los cuales disminuyen durante la etapa del secado. La acidez del mucilago cambia de 1.1 % a 5.4 % de ácido cítrico, en el caso del cotiledón de 0.28 a 5.4 % de ácido cítrico. Riera (2009), señala que los ácidos orgánicos del cacao aportan acidez al grano, dichos compuestos se encuentran entre el 0.9 – 1.6%; algunos de estos ácidos que se forman durante la fermentación y que dan el sabor al cacao son el ácido acético, cítrico y oxálico.

El incremento en el pH sucede lo contrario con la acidez y se observa una disminución la cual concuerda con otros trabajos y esto puede deberse a varios factores como lo menciona Esto certifica que el proceso de fermentación que se realizó permitió obtener un producto de alta calidad (Alvarez, *et al.*, 2010). Los datos de esta investigación coinciden con muchos autores, que indican que se desarrollaron una buena fermentación.

#### **5.2.4. Contenido de sólidos solubles en fermentación del cacao**

El contenido de sólidos solubles del mucilago, expresados como grados brix, se aprecia en la tabla 18 y figura 14, la tendencia fue que inicialmente fue 17.10 °brix, descendiendo de acuerdo al tiempo de fermentación, agotándose a las 84 horas. Los sólidos solubles representan el contenido de azúcares presentes en el mucilago los cuales son consumidos por las levaduras durante la primera fase de la fermentación, convirtiendo los azúcares en alcohol y demás compuestos aromáticos; estos resultados son similares a lo reportado por Palomino y Aquino (2017), que los azúcares se agotaron a los 3 días (72 horas) de fermentación; Alas y Ríos (2012), indican que el azúcar inicial de 16.5 °brix, se agotaron a los 3 días de fermentación, pues las levaduras van en aumento transformando los azúcares sencillos de la pulpa en alcohol, degradando la pectina, lo que modifica la textura del grano y elimina el ácido cítrico disminuyendo la acidez. Vílchez (2011), menciona que la cantidad de sólidos solubles en el mucílago, condicionan el grado de fermentación y en consecuencia la calidad del producto, asimismo que el azúcar se agota a los 3 días y 12 horas de fermentación. Bravo (2010), menciona que el azúcar inicial en el mucílago se agota durante la fermentación anaeróbica, debido a la conversión de los azúcares en alcohol por acción de las levaduras, siendo los azúcares también eliminados a través del exudado.

#### **5.4.5. Humedad del cacao en la fermentación**

La humedad durante la fermentación es importante, puesto que permite dar las condiciones para el desarrollo y actividad de los microorganismos, en la tabla 20 y figura 16, se tiene el reporte de datos de control, en todos los tratamientos hay una pérdida grande de humedad en las primeras 24 horas, de 42.75 % a 44.10, baja a un promedio de 36%; luego la tendencia de pérdida de humedad es lento hasta llegar al término de la fermentación L1: 35.20 %, L2: 35.55 %, LE1: 35.36%, LE2: 35.30%, E1: 36.40%, E2: 36.10% y T: 36.10 %; existiendo

una pérdida de humedad promedio de 18.10 %; a partir de las 24 horas básicamente hay migración de humedad del interior del cotiledón hacia la cáscara. Portillo A (2012), afirma que el cacao pierde mayor humedad hasta las 24 horas por el escurrido del mucilago, de 39.5 % hasta 33.5 a 34.5 %, siendo al final de fermentación por seis días a 32.30 %, que la humedad de fermentación incide directamente en la humedad final del cacao seco. Bravo (2010), menciona que luego del 1° día el contenido de humedad no varía significativamente durante el proceso de fermentación en todos los tratamientos debido a que solo existe transferencia de humedad de la almendra hacia la superficie. Portillo et al. (2009), dice que la pérdida mayor de humedad se presenta en las primeras horas de fermentación, esta humedad es importante para la formación de los compuestos pirólicos y otros compuestos bioquímicos. En tal sentido los datos de la fermentación de esta investigación se hallan dentro de los parámetros de una correcta fermentación.

#### **5.2.6. Contenido de alcohol en fermentación del cacao**

La cantidad de alcohol que se forma en la fermentación, se convierte en ácido acético, por acción de las bacterias acéticas. En la tabla 19 y figura 15, la presencia de ácido acético se aprecia a las 12 horas de fermentación, alcanzando a las 72 horas valores de (L1: 10.00, LE1:10.10, LE2: 9.90, E1: 11.10 y E2: 11.40) % de alcohol, a 84 horas en L2: 10.20 y T: 10.50 % de alcohol; luego disminuyendo al final de la fermentación a valores de 1.50 a 2.8° %. Sinche (2011), menciona que la levadura inicia la fermentación alcohólica transformando los azúcares en alcohol etílico, ocurre el desprendimiento del anhídrido carbónico y metaboliza el ácido cítrico elevando la temperatura y pH. Debido a las altas temperaturas el pH se eleva y las condiciones anaeróbicas empiezan el desarrollo a bacterias lácteas iniciando la fermentación acética; determinando la producción de 9.8 a 10.2 % de alcohol en la fermentación del cacao. Alas y Ríos (2012), determinaron el comportamiento

del alcohol que al inicio es de 0%, a las 24 horas hubo aumento considerable en el método tradicional con 1.4%, a las 48 horas se obtuvo 14.2 %, luego a las 60 horas una disminución a 10.67%, a las 72 horas 8.25 % y al termino de fermentación a 120 horas 3.2 % de alcohol, debido a las bacterias acéticas que trasforman el alcohol a ácido acético. Ortiz et al (2009), afirma que la cantidad de alcohol producido en la fermentación está en relación directa al porcentaje de azúcar inicial del mucílago, determinando el nivel máximo de 13 % y conduce a la muerte de las levaduras y crecimiento de las bacterias lácticas. De los resultados obtenidos el tratamiento E2, produjo 11.4 % de alcohol y el menor LE2: 9.90 %, se hallan dentro de lo determinado por otros autores, para una fermentación adecuada.

#### **5.2.7. Contenido de ácido acético**

Los datos de la tabla 21 y figura 17, permite apreciar la presencia de ácido acético en la fermentación desde las 12 horas, hasta al final del proceso donde el tratamiento L1 produce 10.10 % de ácido acético y el mayor el tratamiento E2: 12.10 % de este ácido; estos resultados coincide con otras experiencias. Alas y Ríos (2011), al inicio da un valor de 0%, a las 24 horas aumenta a 9.8% a loa 48 horas a 15.8%, a las 72 horas hubo una disminución considerable a 7.07%, al final del proceso se incrementó a 11.47, ya no se produce más ácido acético porque no desarrollaron más las bacterias acéticas debido a la baja de la temperatura a 32°C. Bercian y Mata (2012), reporta a las 24 horas 0.33 % de ácido acético, a las 48 horas 1.9 %, a las 72 horas 4.6 %, al final de la fermentación 12.1 % de ácido acético. Lemus *et al* (2002), dice que principalmente durante la fermentación acética del cacao, el color del grano cambia a una tonalidad parda y fija las características fisicoquímicas y sensoriales del grano. Cros y Jeanjean (1995), El oscurecimiento de los granos durante el proceso de fermentación acética, es producido por la hidrólisis de las antocianinas y la posterior oxidación de las agliconas resultantes a compuestos quinónicos,

los cuales contribuyen al color pardo propio del cacao fermentado. El desarrollo de la fermentación acética va depender del tipo de cacao, cantidad de azúcares iniciales en el mucilago, desarrollo de la fermentación alcohólica y aireación correcta.

### **5.3. VARIACIÓN DE CONTENIDO DE COMPUESTOS BIOACTIVOS POR PROCESO DE FERMENTACION DEL CACAO**

#### **5.3.1. Capacidad antioxidante**

Se aprecia en la tabla 22 y figura 18, las características de variación de capacidad antioxidante (ug E trolox/mg cacao) del cacao por efectos de la fermentación, existiendo incremento de 110.12 hasta 246.7 ug E trolox/mg cacao, y en el tratamiento E1 231.3 ug E trolox/mg cacao. Recalde (2007), dice que la capacidad antioxidante del cacao aumenta con el proceso de fermentación, de 135.76 a 268.67 7 ug E trolox/mg cacao, estas varían de acuerdo al tipo de cacao y época de cosecha. Cienfuegos (2016), determino para cacao cosechado 141.57 7 ug E trolox/mg cacao, en cacao fermentado seco 264.1 7 ug E trolox/mg cacao. Zapata et al (2013), reporta para cacao cosechado varía entre 51,59 y 167,80 ug E trolox/mg cacao, y para granos fermentados 153,75 y 264,64 ug E trolox/mg cacao. Los clones de cacao que presentaron mayor potencial antioxidante fueron ICS1, ICS 60 y TSH 565, los clones de cacao criollo es el que posee menor capacidad antioxidante. Lambert (2008), afirma que cabe resaltar que los diversos granos de los clones de cacao colombiano forasteros y trinitarios poseen actividad antioxidante muy superior a los clones de cacao criollo. Los resultados hallados en la investigación concuerdan con los reportes de los diversos investigadores.

### 5.3.2. Contenido de polifenoles totales

Las características de los polifenoles totales determinados, se reporta en la tabla 23 y figura 19, donde se el cacao cosechado tiene 93.25 mg EAG/mg cacao, al término de la fermentación el tratamiento L1 obtiene 90.76 mg EAG/mg cacao, L2 100.12 mg EAG/mg cacao, se nota que la alta población de *Saccharomyces cerevisiae* influye negativamente durante la fermentación, en el desarrollo de polifenoles totales. Sin embargo los demás tratamientos, al final del proceso, el Tratamiento T llega a 167.62 mg EAG/mg cacao, y E1 a 158.09 mg EAG/mg cacao. El contenido de polifenoles totales varió en un intervalo de 169. 21 y 238.64 mg EAG/mg cacao, en granos sin fermentar, y 220.58 y 25023 mg EAG/mg cacao, en granos fermentados para clones de cacao ICS 60 y ICS 1, en clones CCN51 no hay cambios por la fermentación y en clones de cacao criollo el contenido de polifenoles es menor 112.23 en cacao sin fermentar y 152.46 mg EAG/mg cacao en cacao fermentado, (Zapata *et al.*, 2013). Por otro lado, el incremento de los polifenoles durante el proceso de fermentación puede reflejar una formación de proantocianidinas poliméricas (taninos), (vallejo *et al.*, 2003). El contenido de polifenoles totales de las almendras de cacao disminuyen en función del tiempo de fermentación, obteniéndose valores entre 142.45 y 92.79, mg EAG/mg cacao, Portillo (2012).

Los polifenoles de la semilla del cacao están almacenados en células distribuidas en grupos a través de los cotiledones; son compuestos que participan activamente en las modificaciones bioquímicas en el interior de las almendras durante la fermentación, como la oxidación enzimática, que puede causar la disminución del contenido de polifenoles, (Calderón, 2002). Existen varios factores internos y externos que afectan la cantidad de los compuestos fenólicos en el cacao, como la diversidad genética (variedad y clones, época de cosecha y estado de madurez), variables ambientales (intensidad de la luz, temperatura, uso

de fertilizantes, heridas), procesamiento (fermentación, secado, tostado, alcalinización) y almacenamiento, (Niemenak et al., 2006). Entonces los resultados obtenidos, concuerdan con lo estipulado por los investigadores sobre contenido de polifenoles en cacao; el efecto de la fermentación sobre los tratamientos de fermentación de cacao no fue uniforme, observándose cambios positivos y negativos en los contenidos de los diversos metabolitos secundarios, en dependencia de la variedad y tipo de clon.

### **5.3.3. Contenido de teobromina**

Existe una disminución del contenido de teobromina de 0.81 % en cacao cosechado a 0.48 a 0.55 % en cacao fermentado seco, como se aprecia en la tabla 24 y figura 24. La variedad de cacao criollo normalmente poseen teobromina valores menores a 1.3 % en grano fresco y en grano fermentado de 0.5 a 0.90 % (Davrieux *et al.*, 2005). La tendencia del contenido de teobromina por fermentación de cacao es disminuir de 1.48 a 1.25 %, (Rivera *et al.*, 2012). El contenido de teobromina en cacao criollo porcelana al inicio de la fermentación es 1.02 %, al final 0.59 %, (Portillo A, 2012). El cacao fresco posee 1.3 % de teobromina, mientras el cacao fermentado seco presenta 1.1 %, (Sinche, 2011). El cacao fresco tiene 1.45 % de teobromina y el grano seco 1.34 %, (Morales *et al.*, 2016). (Wakao, 2002), Manifiesta que con contenidos de teobromina disminuye a medida que avanza la fermentación, de esa forma pierde 24 % aproximadamente, además indica que el sabor amargo del cacao está predominado por el contenido de purinas como la teobromina. Los datos obtenidos en la investigación se hallan dentro de los parámetros hallados por muchos investigadores, existe variabilidad en otros casos por efectos de variedad, temporada de cosecha y factores climáticos del área de cultivo.



## **5.4. EVALUACION DE LA CALIDAD DEL GRANO FERMENTADO Y SECO**

### **5.4.1. Evaluación física del grano fermentado seco**

En la tabla 25, se tiene los datos de rendimiento de cotiledón y cascarilla de cacao fermentado para los seis tratamientos más el testigo. Para el cotiledón varía de 82.83 % a 85.39 %, la cascarilla de 14.61 a 17.17 %. Los valores medios de contenido de cascarilla evaluados en este trabajo se ubicaron dentro de los rangos establecidos, con un rango de 9,7% a 17,7%, (Martínez, 2016). La cascarilla representa del 10 al 17% del peso seco total del grano y el cotiledón representa la mayor parte del grano (86-90%) y que la cascarilla puede contener aproximadamente el 40% del total de la fibra dietaria (Redgwell *et al.*, 2003). El contenido más alto de cascarilla en cacao en ICS 95 fue 15,4%, el cacao criollo presentó también el valor 17,7% y FTA 2 15%, (Kuman, 2001) El porcentaje de cascarilla determinado está dentro de los rangos hallados por estos investigadores.

El rendimiento promedio de los granos de cacao en estudio reportado en la tabla 26, varía de 1.30 a 1.48 g. Cardona *et al.* (2016), determino el peso promedio de los granos de cacao criollo varía de 1.28 a 1.58 g. Palomino y Aquino hallaron granos de cacao que se hallan de 1.30 a 1.60 g. De acuerdo a estas experiencias los granos de cacao beneficiado, se hallan dentro de los estándares reportados.

El contenido de ceniza de cada tratamiento se halla en la tabla 27, cacao fresco posee 2.291 %, seco varía de 2.169 a 2.265 %. El cacao cultivado en Satipo posee 3.22 % de ceniza (Loayza, 2011), El contenido de ceniza del cacao criollo de Cauca varía de 2.79 a 3.62, el grano fresco tiene 3.35 %. (Ortiz, 2008). En los resultados obtenidos se observó valores entre 3,01 y 3,5%, (Bermúdez y Mendoza, 2016). La ceniza es un indicador del grado de fermentación de un grano o indica claramente si un grano fue fermentado o directamente fue

secado al sol, debido a que el cacao fermentado pierde alrededor del 25 % de las cenizas que poseía antes de la fermentación sin hacer diferencia entre genotipos. Además su contenido permite diferenciar un cacao ordinario y fino ya que el primero posee porcentajes mayores a 2.6 % y el segundo menores al 2.5%. (Verdesoto, 2009). Esta afirmación coincide con los resultados hallados pues existe una pérdida de ceniza promedio de 5.01 %, durante el proceso de fermentado y secado, presentando valores menores a 2.5 %.

La humedad final del cacao se halla en valores de 6.90 a 7.50 %, como se muestra en la tabla 27; estos resultados se hallan dentro de las normas INIAP (2009), citado por Díaz y Pinoargot (2012), explica que al finalizar la fermentación, el grano tiene un contenido de humedad de aproximadamente 55%, que debe ser reducido hasta un valor de 6-8%, nivel necesario para su almacenamiento. Asimismo Alcocer, *et al.*, (2015), menciona que este porcentaje de humedad sirve para evitar el desarrollo de mohos que deterioran la calidad del cacao y facilitar su almacenamiento, transporte, manejo y comercialización del cacao. Asimismo Palomino y Aquino (2017), determinaron la humedad del cacao criollo, varía de 6.8 7.6 %. Igualmente si la humedad se encuentra por encima del 8% existe el riesgo del desarrollo de hongos durante el almacenamiento, Álvarez *et al.*, (2010).

#### **5.4.2. Grado de fermentación del cacao**

De acuerdo a los datos reportados en el anexo 3 y figuras del 19 a 25, los tratamientos L2 y LE1, poseen 99 % de fermentación, seguido del tratamiento LE2: 98 %, que son tasas altas, debido a la calidad de la materia prima y buenas características de cosecha y fermentación, al igual que el resto de los tratamientos. A partir del cuarto día fue evaluado el grado de fermentación, en relación que transcurra la fermentación se reducen los defectos (Granos: pizarra, violeta, parcialmente fermentado) y se incrementa los granos bien fermentados;

Coincide con lo determinado por Palomino y Aquino que al cuarto día observaron altas tasas de defectos, terminado la fermentación y secado las tasas fueron de 73.0 a 81 % de granos bien fermentados. Morales et al., (2016) determinaron granos bien fermentados de 67 a 89 %. (Sanchez, 2007), obtuvo en su estudio 89 % como promedio para fermentación buena, valor similar al obtenido en la presente investigación. Además se debe considerar que el porcentaje de fermentación depende a factores externos como la temperatura, tiempo y variedad de cacao. (Braudeu, 1970). Sinche (2011), El porcentaje mínimo de para cacao especial es 50% (INDECOPI, 2011; INACAL, 2016), en la investigación se obtuvo grado de buena fermentación de 63 hasta 100%, que indica que todos los granos se fermentaron adecuadamente.

Bravo (2010), indica que la prueba de corte es la más importante para determinar la calidad de cacao a través del corte longitudinal de los granos y se efectúa un análisis visual de las dos caras del cotiledón, es determinante para establecer la clasificación del grano y lograr la identificación de los defectos más graves como moho, insectos y pizarroso. Rivera *et al.* (2012), obtuvo granos violetas inversos a los granos fermentados, es decir que a medida que aumenta el tiempo de fermentación disminuye el porcentaje de granos violeta reduciéndose alrededor de 90% en 6 días de fermentación. Vílchez (2016), obtuvo valores de granos bien fermentados superiores a 95.5 %.

A nivel estadístico cuyos análisis de varianza se muestra en el anexo 4 y tablas del 28 al 31, de acuerdo a la prueba de tukey a de 95%, que se muestra en las figuras del 28 31, para granos pizarrosos el tratamiento LE1 establece diferencia significativa respecto a los demás tratamientos. Para granos pizarrosos los tratamientos: E2, LE2 y LE1, establecen diferencia significativa respecto a los demás tratamientos. En fermentación parcial los que poseen

mejores características son los tratamientos LE1 y LE2, establecen diferencia significativa en relación a los demás tratamientos. En relación a porcentaje de granos bien fermentados el tratamiento L2 establece diferencia significativa respecto a los demás tratamientos, sin embargo estos valores no significa que sean los mejores en calidad sensorial.

### **5.4.3. Características microbiológicas**

#### **a. Levaduras**

Como se observa en la tabla 32, la población de levaduras ya existía en la masa de cacao siendo  $6.5 \times 10^2$  UFC/g, alcanzando máxima población a las 24 horas que varía de  $3.9 \times 10^6$  a  $8.0 \times 10^6$  UFC/g, cayendo al final de la fermentación de  $< 10$  a  $1.0 \times 10^2$  UFC/g. Sinche (2011), obtuvo resultado de los análisis de levaduras sometidos al grano de cacao, donde la población son valores menores a 10 UFC./g. Lo que indica que el grano de cacao se encuentra en óptimas condiciones microbiológicas para ser almacenada y elaborar pasta de cacao. Alas y Rios (2011), determinan a las 24 horas población de levaduras de  $12.5 \times 10^6$  UFC/g, a las 48 horas  $37.5 \times 10^5$  UFC/g, luego baja hasta  $0.8 \times 10^2$  UFC/g, en cacao seco. Bresión y Mata (2012), hallaron a las 24 horas  $4.8 \times 10^5$  UFC/g, a las 48 horas  $7.8 \times 10^6$  UFC/g, como cacao seco  $< 10$  UFC/g. Los datos hallados son menores a los determinados por los otros autores, esto debe ser porque se trabajó en ambiente limpio y aislado.

#### **b. Hongos**

Los hongos es un indicador de formación de aflatoxinas durante la etapa de almacenamiento, durante la fermentación genera compuestos no deseados en la calidad del grano seco, por naturaleza existe en el mucilago, en cantidades mínimas. Como se aprecia en la tabla 33, en algunos tratamientos se determinó a las 48 horas de fermentación una población de hasta  $4.0 \times 10^2$ , que se pierde hasta el final del proceso. Como grano seco

presenta valores menores a 10 UFC, que no representa peligro de formación de aflatoxinas durante el almacenamiento. Sinche (2011), halla cantidad similar a lo reportado.

### **c. Bacterias acéticas**

De acuerdo al reporte en la tabla 34, estas bacterias aparecen a las horas de iniciado la fermentación, responsables de la fermentación acética, por presencia principalmente del acetobacter aceti, determinándose mayor presencia al final de la fermentación valores de  $1.1 \times 10^4$  a  $1.4 \times 10^4$ , que se elimina por efectos del secado de los granos de cacao, siendo su presencia menor a 10 UFC/g de cacao. Arango (2017), determino al final de la fermentación un valor promedio de  $1.7 \times 10^4$  UFC/g; Brecian y Mata (2016), hallaron  $1.2 \times 10^4$  a  $1.7 \times 10^4$  UFC/g; asimismo Alas y Rios (2012), determinan en proceso tradicional  $6.33 \times 10^5$  UFC/g, al final de la fermentación. Los valores hallados en la investigación están son ligeramente inferior a lo determinado por estos autores.

#### **5.4.4. Calidad sensorial del cacao**

Los resultados obtenidos de la evaluación sensorial por panelistas expertos (anexos 5 y 6), tabla 35 y figuras del 28 al 33, muestran que los seis tratamientos en estudio con calificaciones que varían de 64.00 a 80.33, se hallan categorizados como cacao de calidad y cacao especial, de acuerdo a las categorías establecidas por USAID y APPCACAO.

Para el atributo **olor**, el tratamiento E2 (con adición de enzima pectinasa de 0.14 ml), presenta mejor característica 8.67 de 10 puntos, posee olor a frutal, nueces y ajonjolí. El tratamiento E1 (con adición de enzima pectinasa 0.07 ml), secunda en cuanto a este atributo con 8.33 puntos, con fragancia cítricos, a floral ligero. El tratamiento LE2 (con adición de levadura al 0.10 % y 0.14 ml de enzima pectinasa) posee un puntaje de 7.33, con olor a láctico, avena y frutal; tratamiento L2 (con adición de levadura al 0.10 %), aroma a frutal y

manzana, Tratamiento L1 (con adición de levadura al 0.05 %), olor a nueces, herbal y frutal; Tratamiento LE1 (con adición de levadura al 0.05 % y 0.07 ml de enzima pectinasa), con 6.33 puntos, olor a lácteos, madera y frutal y el tratamiento testigo con 8.00 puntos, aroma a fruta cítrica madura y nuez. La adición de levaduras y la mezcla levaduras-enzimas no mejoran el olor del cacao. Los perfiles de olor determinados indican que los tratamientos con adición de enzima son los que poseen mejor olor.

La acidez de los tratamientos evaluados indican que la muestra E2 posee mejor característica con 8.67 puntos, típico a cítrico limón dulce; el tratamiento E1 con 8.33 puntos, con acidez típico a cítrico limón dulce; frente al tratamiento testigo que posee 7.67 puntos con característica a cítrico y almendra; los demás tratamientos poseen acidez similares. La adición de enzima pectinasa en la fermentación favorece el mejor desarrollo de la acidez en los granos de cacao.

El atributo amargor es consecuencia del contenido de purinas, en tal sentido el Tratamiento E2 presenta una calificación de 9.00 puntos, con tendencia baja, asimismo el Tratamiento E1 con 8.67 puntos, con tendencia regular. El resto de los tratamientos presentan características similares con amargor tendiente de medio a bajo, es buen indicador de una característica buena. La astringencia forma parte del complejo sabor del chocolate, pero su presencia excesiva llega a ser desagradable. El exceso de amargor y de astringencia no se puede eliminar con la elaboración industrial normal. Estos sabores están asociados con una fermentación insuficiente y/o ciertas variedades, principalmente los forasteros; el Tratamiento E2 al igual que el tratamiento testigo, poseen mejores características con 8.33 puntos de calificación, con tendencia bajo; similares características poseen los demás tratamientos.

El sabor es un atributo importante de calidad para los granos de cacao. El criterio del sabor involucra la intensidad del sabor a cacao o chocolate, junto con otros factores aromáticos secundarios, así como con la ausencia de sabores indeseados. Entre los defectos principales se tiene, la falta de fermentación, la fermentación excesiva y la contaminación, principalmente por mohos. El tratamiento E2 tiene una calificación de 18 de 20, con aroma a nueces, chocolate, ajonjolí, panela y cítrico dulce; secundado por el tratamiento E1 con 16.67, con aroma a cítrico, manzana, chocolate, guindones y nueces, característica similar al tratamiento testigo.

La limpieza es el adecuado en todos los tratamientos. El post gusto es la sensación de satisfacción que se siente luego de degustado el cacao. El tratamiento E2 destaca con 8.67 puntos de calificación, con sensación a frutal, nueces, durazno y chocolate. Característica similar al tratamiento testigo; los demás tratamientos poseen rasgos similares.

La adición de enzima pectinolítica influye positivamente en el desarrollo del perfil sensorial del cacao fermentado, mejorando sus atributos, incluso hasta el nivel de cacao especial en el caso de tratamiento E2. En el caso de tratamientos con adición de levaduras y mezcla de levadura-enzima, no se observa acción positiva en el perfil sensorial del grano de cacao.

Ramos (2014), afirma que ha encontrado que los aromas y sabores específicos del cacao, son generados por procesos enzimáticos que se producen durante el beneficio pos cosecha de los granos, donde una sucesión de microorganismos contribuyen con el desarrollo de los compuestos de aroma y sabor. Gonzales (2012), señala que el logro de un buen chocolate inicia en la planta, cosecha, beneficio y las distintas fases de procesamiento involucradas en el desarrollo del mismo, durante estas etapas actúan diferentes factores que inciden en su

calidad sensorial, pero se desconoce el grado de influencia que tienen los constituyentes del grano.

Arroyo (2010), explica que un gran número de compuestos son comunes a todos los cacaos; sin embargo numerosos compuestos son específicos a genotipos determinados y que los principales compuestos químicos encontrados en los granos de alguna manera tienen influencia en las características organolépticas, los cuales son: polifenólicos (astringencia), purinas (amargor), esterés (sabor frutal), y ácidos principalmente el acético (acidez). Mejía (2012), menciona que las bacterias del ácido acético juegan un papel clave en la formación de los precursores del sabor a chocolate.

Navia y Pazmiño (2012), describe al cacao forastero como fuerte y amargo, ligeramente ácidos, con mucho tanino y astringencia, tienen una gran potencia aromática, pero sin finura ni diversidad de sabores; cacao criollo: poseen un amargor suave, sabores ácidos y afrutados, poco astringentes, poseen una sutileza y delicadeza aromática, pueden detectarse sabores a frutas ácidas como cítricos, frutas del bosque, etc.; cacao trinitario: incorpora aspectos de las variedades criollo y forastero, afrutado y perfumado, tiene un amplio rango de sabores. aromático y persistente en boca, pueden apreciarse sabores a heno, roble, miel y notas verdes como manzana. Todas estas características determinan un punto dominante en la calificación del cacao. Asimismo, Armijos (2002), Calderón (2002) y Graziani *et al.*, (2003), citados por Sánchez (2007), mencionan que el cacao debe desarrollar el aroma y el característico sabor “arriba”, para que sea calificado como de primera calidad, estas cualidades se desarrollan solamente cuando las almendras son debidamente fermentadas y secadas y son tostadas.



APPCACAO (2012), explica que la astringencia se debe a la falta de fermentación, que se siente entre la lengua y la campanilla y detrás de los dientes y el sabor que es una sensación estimulada por sustancias solubles, estas sensaciones son detectadas en combinación del gusto y el olfato; el 80% de lo que se detecta como sabor es procedente de las sensaciones del olor. Arango (2017), menciona que la adición de levaduras en un proceso de fermentación de cacao genera resultados favorables en el sabor y aroma del clon de cacao CCN51, teniendo en cuenta la alta cantidad de mucílago que este contiene. La combinación de presecado más levaduras no es favorable para las demás características.

Bercian y Mata (2012), afirman que El azúcar presente en el mucílago no es suficiente para el alimento de las levaduras incrementadas que se desarrollan en las cajas, por lo que la vida de estas es muy corta y al no haber reproducción de levaduras el tiempo de fermentación alcohólica es corta, afectando directamente en la calidad de los granos de cacao, principalmente las características sensoriales del cacao ya que se generan sabores a sobre fermentado debido probablemente al poco sustrato disponible para las levaduras adicionadas al proceso de fermentación. Morales et al. (2015), afirma que la adición de levadura *Saccharomyces cerevisiae* durante la fermentación por 7 días mejora la calidad del grano de cacao, en comparación con los testigos en blanco, pero sin embargo no alcanza los parámetros del cacao nacional y los tratamientos con enzima polifenol oxidasa (PPO).

Existe una correlación alta y positiva entre el aroma frutal y el sabor dulce, que son percibidos en cacao fino bien fermentado, asimismo entre los aromas frutal y cacao que se destacan en las muestras de cacao criollo bien fermentado (Counet *et al.*, 2004). Se ha observado que existe correlación positiva entre el nivel de fermentación y la expresión de

aromas florales, frutales y dulces con cacao bien fermentado de calidad especial, (Menezes *et al.*, 2016).

En el anexo 7, se presentan los resultados del análisis de varianza (ANVA), de la evaluación sensorial. En la tablas del 36 al 43, si tiene la prueba de Tukey para los atributos olor/fragancia, acidez, amargor, astringencia, sabor/aroma, limpieza, post gusto y puntaje del catador, donde el tratamiento E2 posee el mejor perfil sensorial, seguido del tratamiento E1, superando al tratamiento testigo y demás tratamientos.

## CONCLUSIONES

Existen efectos positivos de adición de enzima pectolítica en las características de fermentación de cacao, en la calidad fisicoquímica y sensorial. El tratamiento E2 (adición de enzima 0.14/3.5 kg de masa de cacao o 0.04 ml/kg de masa de cacao), posee una calidad de grano de cacao especial fino, con una puntuación de 80.33, elevando en 4.66 puntos el perfil sensorial del cacao seco, respecto al testigo con fermentación convencional, que posee 75.67 puntos. Asimismo el Tratamiento E1 (adición de enzima 0.07ml/3.5 kg de masa de cacao), obtiene un perfil sensorial de 77.33 puntos, que lo califica como cacao especial, superior al testigo. Asimismo la adición de enzima permite minorar el tiempo de fermentación en 24 horas (1 día) en relación a los demás tratamientos. Los tratamientos con adición de levaduras *Saccharomyces cerevisiae*, no tienen efectos positivos en el perfil sensorial del cacao, en relación a muestra testigo, incluso poseen puntajes menores como (L1:64.67, L2: 69.00, LE1: 64.00 y LE2:70.00) puntos, que son considerados como cacao especial.

Las características de fermentación del cacao con adición de enzima pectolítica, mejoran en relación al proceso convencional y con adición de levadura *Saccharomyces Cereviceae*; los tratamientos con adición de enzima pectolítica son granos con acidez adecuada, menor amargor y menos astringentes, con buen aroma, en relación a los tratamientos donde se adicionó levadura. Los efectos en cuanto a capacidad de antioxidantes son similares al testigo, sin embargo en los tratamientos con adición de solo levadura, presenta un efecto negativo ligero L1: 179.44 y L2: 187.49 ug Etrolox/mg cacao, respecto al T: 246.70 ug Etrolox/mg cacao. En cuanto polifenoles totales Los tratamientos con adición de enzima muestran mejores características en relación a los tratamientos con adición de solo levadura.

Respecto al efecto sobre cantidad de teobromina, no existe diferencia significativa entre los tratamientos.

La adición de enzima pectolítica y levadura *Saccharomyces cerevisiae*, tiene efectos benéficos en la calidad del grano de cacao fermentado. Todos los tratamientos evaluados cumplen con las exigencias de las normas técnicas, respecto a la calidad, no presentan granos quebrados 0 %, granos violetas menores a 8 %, granos pizarra menores a 3%, granos parcialmente fermentados menor a 5 %, granos con mohos 0 % y granos bien fermentados superior a 86 %; la humedad final del cacao seco se halla de 6.90 a 7.5 %, que permite calificar como un cacao de calidad y cacao especial, para el mercado internacional, de acuerdo a las normas técnicas de calidad.

El cacao fue evaluado como pasta de cacao, la aceptabilidad del cacao fermentado con adición de enzima pectolítica y levadura *Saccharomyces cerevisiae*, es positivo en los tratamientos con adición de enzima, con un juicio de post gusto de sabor a cítrico dulce, durazno, chocolate, nueces; que son juicios para cacao de calidad, el caso del tratamiento E2, se constituye como cacao de calidad fino, con 80.33 puntos y E1 obtiene 77.33 puntos, catalogado como cacao especial. El cacao fermentado con adición de levaduras logran la calificación de cacao especial.

## RECOMENDACIONES

De acuerdo a los resultados, discusiones y conclusiones de este trabajo de investigación, me permito formular las siguientes observaciones:

- La calidad del cacao se inicia desde la etapa agrícola, fermentación, secado y torrefacción, es de interés desarrollar investigaciones sobre diferentes métodos de secado natural sobre piso y parrilla y periodos de remoción.
- Desarrollar investigaciones relacionados a la adición de azúcares al inicio de la fermentación para adicionar cepas de levadura en la fermentación para evaluar los efectos en la calidad sensorial del cacao fermentado.
- Difundir los beneficios del uso en la fermentación del cacao, de la enzima pectolítica, mediante la capacitación de agricultores líderes, cooperativas de cacaoteros, asociación de productores de cacao, a fin de mejorar la calidad sensorial del cacao.
-

## REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- Aduanas del Perú. (2014). Reporte de exportaciones de cacao y derivados año 2014. Recuperado de: [www.sunat.gob.pe/operatividadaduanera](http://www.sunat.gob.pe/operatividadaduanera).
- Adriazola, J. (2003). Producción del alimento de los dioses (*Theobroma cacao L.*) Universidad Nacional Agraria de la Selva. Tingo María, Perú.
- Afoakwa, E.; Paterson, A.; Fowler, M. & Ryan, A. (2008). Flavor formation and character in cocoa and chocolate: a critical review. *Critical reviews in food science and nutrition*.
- Agraria. (2013). *Cacao potencial agrario*. Revista del Centro Peruano de Estudios Sociales-CEPES. Lima Perú. Recuperado de: [www.agraria@cepes.org.pe](http://www.agraria@cepes.org.pe).
- Alas, C., y Rios, C. (2012). Evaluación del proceso de fermentación tradicional y no tradicional de la semilla de cacao *Theobroma cacao*, del ecotipo acriollado, por la determinación de factores físicos – químico y microbiológicos, utilizando cuatro medios de cultivos y levadura *Sacharomyces cereviseae* como iniciador de fermentación en el método no tradicional. Tesis Universidad Dr. José Matías Delgado. México.
- Alcocer, E., y Sandy, X. (2015). Manual de control de calidad en laboratorio y centro de acopio. Editor Wildlife Conservation Society (WCS).
- Álvarez, C., Pérez, E. y Lares, M. (2007). Caracterización física y química de almendras de cacao fermentadas, secas y tostadas cultivadas en la Región de Cuyagua, Estado Aragua. *Revista Agronomía Tropical* Vol. 57. Caracas, Venezuela.
- Álvarez, C., Tovar, L., García, H., Morillo, F., Sánchez, P., De Farías, A. (2010). Evaluación de la calidad comercial del grano de cacao (*Theobroma cacao L.*) usando dos tipos de fermentadores. *Revista 76 Científica UDO Agrícola*. Recuperado de: <file:///C:/Users/Antonio/Downloads/DialnetAtributosFisicosquimicosYSensorialesDeLasAlmendras>.

- Andrade, A. (2009). Efecto de la utilización de enzimas pectolíticas (Lallzyme c-max) en un mosto elaborado con levadura vínica (Lalvin ec 1118) y de panificación para la producción de vino de manzana variedad emilia (Reineta amarilla de Blenheim). Tesis de Maestría. Universidad Técnica de Ambato. Ecuador.
- AOAC Association of Official Analytical Chemist. (2005). Official methods of analysis. 18th Edition. Gaithersburg, Maryland. USA.
- AOAC. (1996). Official methods of analysis of the association of official analytical chemists. Thirteenth Ed. Washington, DC. 20044 USA.
- AOAC. (1990). Official methods of analysis of the association of official analytical chemists. Thirteenth Ed. Washington, DC. 20044 USA.
- APPCACAO, (2012). Asociación peruana de productores de cacao. Manual de control de calidad del cacao.
- APPCACAO. (2016). Bases para Concurso nacional de Cacao Peruano. Recuperado de: <https://appcacao.wordpress.com/bases>.
- Arango, J. (2017). Evaluación del efecto de técnicas de fermentación en el sabor y aroma de cacao CCN-51 (Theobroma Cacao L) en la zona de Tumaco-Nariño. Tesis para grado de Magister. Universidad Nacional de Colombia. Recuperado de: <http://www.bdigital.unal.edu.co/57144/13/JessicaArangoAngarita%20.2017.pdf>.
- Arévalo. (2011). Identificación del cacao criollo como producto nativo de la biodiversidad de San Martín y evaluación de su potencialidad regional. Perú biodiverso. Lima, Perú. Revista Perú biodiverso, N° 0035. Recuperado de: <http://perubiodiverso.pe/assets/Identificaci%C3%B3n-del-cacao-nativo-San-Mart/pdf>.
- Argout, X., Fouet, O., Wincker, P., Gramacho, K., Legavre, T., Sabau, X., & Kuhn, D. (2008). Towards the understanding of the cocoa transcriptome: Production and analysis

- of an exhaustive dataset of ESTs of *Theobroma cacao* L. generated from various tissues and under various conditions. *BMC genomics*,
- Armijos, A. (2002). Característica de acidez como parámetros químico de calidad en muestras de cacao (*Theobroma cacao* L) fino y ordinario de producción nacional durante la fermentación. Tesis Dr. Química Pontificia Universidad Católica del Ecuador. Facultad de Ciencia Exactas y Naturales. Quito, Ecuador.
- Arroyo, M. (2010). Efecto de fermentador y tipos de fermentación sobre la calidad de cacao Nacional en tres localidades de la Provincia de Esmeraldas. Tesis de Grado de Ingeniería Agronómica. Facultad de Ingeniería Agronómica. Universidad Técnica de Manabí.
- Augstburger, F., Berger, J., Censkowsky, U., Heid, P., Milz, J., & Streit, C. (2000). Agricultura orgánica en el trópico y subtrópico, Guías de 18 cultivos (1a ed.). Alemania: Asociación Naturland. Disponible en: [http://www.fec-chiapas.com.mx/sistema/biblioteca\\_digital/agricultura-organica-cacao.pdf](http://www.fec-chiapas.com.mx/sistema/biblioteca_digital/agricultura-organica-cacao.pdf).
- Batista, N., Ramos, C., Días, D., Pinheiro, A., & Schwan, R. (2015). The impact of yeast starter cultures on the microbial communities and volatile compounds in cocoa fermentation and the resulting sensory attributes of chocolate. *Journal of Food Science and Technology*.
- Bercian, J., y Mata, D. (2012). Evaluación y determinación de los factores físicos -químicos y microbiológico sobre el índice de fermentación tradicional y no tradicional del grano cacao (*Theobroma cacao*) forastero, cultivado en la hacienda San José del Real la Carrera – Usulután. Tesis grado doctorado. Universidad Dr. José Matias Delegado. Recuperado de: <http://webquery.ujmd.edu.sv/siab/bvirtual/BIBLIOTECA%20VIRTUAL/TESIS/04/IAL/0001702-ADT>.



- Bermúdez, K., y Mendoza, C. (2016). Post-cosecha y secado del grano del cacao nacional fino y de aroma para la determinación de perfiles físicos, bromatológicos y organolépticos. Tesis de titulación. Escuela Superior Politecnica Agropecuaria de Manabí  
Manuel Félix López.  
<http://repositorio.esпам.edu.ec/bitstream/42000/562/2/TAI116.pdf>.
- Betancourt, y Llano. (2009). Extracción de pectinas a partir de los subproductos del beneficio del cacao. Tesis grado Magister en Ingeniería de procesos. Universidad EAFIT. Medellín, Colombia.
- Biehl, B., Meyer, B., & Bin, M. (1989). Cambios de las propiedades fisico-químicas y perfil de ácidos grasos en cacao, durante el beneficio. Recuperado de:  
[http://www.scielo.org.ve/scielo.php?pid=S0002-X2013000100004&script=sci\\_arttext&tlng=pt](http://www.scielo.org.ve/scielo.php?pid=S0002-X2013000100004&script=sci_arttext&tlng=pt)
- Bravo, D. (2010). Evaluación fisicoquímica del comportamiento de las almendras de cacao (*Theobroma cacao L*) de seis clones: ICS -1 (*Imperial Collage Selección*), ICS – 95 (*Imperial Collage Selection*), UF – 613 (*United Fruit*), IMC – 67 (*Iquitos Marañón Colección*), TSH – 565 (*Trinidad Selección Hybrida*), CCN-51 (*Colección Castro Naranjal*) y el cacao criollo durante el proceso de fermentación y secado. Tesis Ingeniero Agroindustrial. Universidad Nacional de San Martín. Perú.
- Bravo, N., y Mingo, F. (2011), Valoración de tres métodos de fermentación y secado para mejorar la calidad y rentabilidad del cacao fino de aroma (*Theobroma cacao L.*) En la parroquia Panguintza del cantón Centinela del Cóndor, provincia de Zamora Chinchipe. Tesis Ing. Industrial. Universidad Nacional de Loja. Loja, Ecuador.
- Biehl, B., Meyer, B., Crone, G., Pollmann, L. (1989). Chemical and physical changes in the pulp during ripening and post-harvest storage of Cocoa Pads. *J. Sci. Food. Agric.*

- Cadena, T. (2008). Evaluación del efecto del procesamiento del cacao sobre el contenido de polifenoles y su actividad antioxidante. Tesis de grado magister. Universidad Industrial de Santander. Bucaramanga, Colombia.
- Cakirer, M., Ziegler, G., Guiltinan, M., Jones, A. (2003) Fresh bean colour as an indicator of chocolate flavour potential. Recuperado de: [infocafes.com/portal/wp-content/uploads/2017/03/Polifenoles-en-cacao.pdf](http://infocafes.com/portal/wp-content/uploads/2017/03/Polifenoles-en-cacao.pdf).
- Calderón, L. (2002). Evaluación de los compuestos fenólicos del cacao (*Theobroma cacao* L.) de tipo fino y ordinario de producción nacional durante la fermentación en relación a la calidad. Tesis de Lic. En Química, Pontificia Universidad Católica del Ecuador, Quito, Ecuador.
- Camino, C. (2014). Estudio del contenido de grasa, alcaloides y polifenoles totales en almendras de cacao nacional fino de aroma en zonas del litoral ecuatoriano para comparar su calidad y facilitar su comercialización. Ing. Bioquímico. Universidad Técnica de Ambato Ambato, Ecuador.
- Cardona, L., Rodríguez, E., y Cadena, E. (2016). Diagnóstico de las prácticas de beneficio del cacao en el departamento de Arauca. Revista La Sallista de Investigación. Vol 13, N° 1. Arauca, Colombia.
- Chávez y Ordoñez (2013). Polifenoles Totales, Antocianinas y Capacidad Antioxidante (DPPH y ABTS) durante el procesamiento del licor y polvo de cacao. UNAS. Revista ECI Perú. Recuperado en: [http://www.encuentrocientificointernacional.org/revista/eci2013irevista/04ronaldchavez\\_polifenolesantioxidantesfinal.pdf](http://www.encuentrocientificointernacional.org/revista/eci2013irevista/04ronaldchavez_polifenolesantioxidantesfinal.pdf).
- Cienfuegos, E. (2016). Estudio del contenido de compuestos bioactivos del cacao y su aplicación en la obtención de un ingrediente rico en polifenoles para el diseño de un

- Chocolate enriquecido. Tesis doctoral. Universidad de Murcia. Recuperado de:  
[www.tesisenred.net/handle/10803/371732](http://www.tesisenred.net/handle/10803/371732)
- Cleenwerck, I., A. González, N., Camu, E, Engelbeen, P., De Vos, L., De Vuyst, D.  
Acetobacter Fabarum, Sp. Nov., an Acetic Acid Bacterium from a Ghanian Cocoa Bean  
Heap Fermentation. International Journal of Systematic and Evolutionary  
Microbiology. Recuperado de: <http://www.freepatentsonline.com/8865246.html>
- Contreras, C., L. Ortiz, L., Graziani, F., y Parra, P. (2002). Fermentadores para cacao usados  
por los productores de la localidad de Cumboto, Venezuela. Agron. Trop. Recuperado  
de:[http://www.scielo.org.ve/scielo.phpS0002-2004000206&script=sci\\_arttext&tIng=en](http://www.scielo.org.ve/scielo.phpS0002-2004000206&script=sci_arttext&tIng=en).
- Counet, C., Callemien, D., & Collin, S. (2004). Chocolate and cocoa: New sources of trans-  
resveratrol and trans-piceid. Food Chemistry. USA. Recuperado de:  
<http://espacioimasd.unach.mx/articulos/num11/pdf/cacao.pdf>
- Cros y Jeanjean. (1995). Cocoa quality: effect of fermentation and drying. Plantations,  
recherche, developpement. Recuperado de:  
<https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=3308653>
- Cros, E. (2000). Factores condicionantes de la calidad del cacao. CIRAD-CP, Maison de la  
Technologie, BP 5035, 34032 Montpellier Cedex 1, Francia. Disponible en:  
<http://www.redcacao.info.ve/memorias/html/02.html>.
- Cuvelier y Berset. (1995). Comparison of the antioxidative activity of some acid-phenols:  
structureactivity relationship. Bioscience Biotechnology Biochemistry. Recuperado de:  
<file:///C:/Users/Downloads/1-s2.0-S0023643895800085-main.pdf>

- Da Silva, M., Gama D., y Rodriguez, H. (2009). Soil and litter fauna\_ of cacao agroforestry systems in Bahia, Brazil. Investigación, Universidad de Sao Paulo. Recuperado de: <https://scholar.google.com.pe/scholar?q=Da+Silva+et+al,+2009,+cacao&hl>
- Davrieux, F., Assemat, D., Sukha, E., Portillo, R., Boulanger, D., Bastianelli, B., y Cros, E. (2005). Genotype characterization of cocoa into genetic groups through caffeine and theobromine content predicted by NIRS. 12th Inter. Conf on NIRS, 14-19 avril 2005, Auckland (New Zealand), sous presse.
- Déak, L., y Beuchat, O. (2008). Fungi and Food Spoilage. Recuperado de: <https://books.google.com.pe/books?isbn=0387922075>
- De la Mota, I. (2008). El Libro del Chocolate. Segunda Edición. Editorial
- De Vuyst y Callebaut (2010). Fermentation of cacao (*Theobroma cacao L.*) seeds with a hybrid *Kluyveromyces marxianus* strain improved product quality attributes. Fems Yeast Research. EE.UU.
- Diaz, S., y Pinoargote, M. (2012). Análisis de las características organolépticas del chocolate a partir de cacao CCN-51 tratado enzimáticamente y tostado a diferentes temperaturas. Tesis Ing. de Alimentos. Guayaquil, Ecuador. Escuela superior politécnica del litoral.
- Dostert, Roque, Cano, La Torre y Welgend (2011). Hoja botánica: Cacao *Theobroma cacao L.* Proyecto Perú biodiverso. Deutsche Gesellschaft für Internationale Zusammenarbeit (GIZ) GmbH Cooperación Suiza – SECO. Lima, Perú.
- Dreosti, E. ( ) Antioxidant Polyphenols in tea, cocoa and wine. Nutrition. Journal Food Composition Analysis. EE.UU. Recuperado de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10906600/pdf>.

- Efraim, P., Pezoa-Garcia, N., Calil, D., Nishikawa, A., Haddad, R., Nogueiraerberlin, M. (2010). Influence of cocoa beans fermentation and drying on the polyphenol content and sensory acceptance. *Rev. Ciencia Tecnología de Aliment.*
- Enriquez, G. (1982). La cura o beneficio del cacao. Capacitación avanzada en cacao en Nicaragua. CATIE. Departamento de Producción Vegetal Turrialba. Costa Rica.
- Fisher, C., & Scott, T. (2000). *Flavores de los alimentos: biología y química*. Editorial Acribia. Zaragoza, España.
- García, P. (2000). Caracterización microbiana, bioquímica y cinética del proceso de fermentación tradicional durante el beneficio de cacao. Tesis para obtener el grado de maestro en Ingeniería Química. Departamento de Ingeniería de Procesos e Hidráulica Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa. Mexico.
- García, C. (a) (2012). Plan de desarrollo de Cultivo de cacao en Perú. Ministerio de Agricultura y Riego (MINAGRI), DEVIDA. Lima Perú.
- García, C. (b) (2012). Cultivares de cacao del Perú. Ministerio de Agricultura y Riego (MINAGRI), DEVIDA. Lima Perú.
- Gestión. (2015). MINAGRI y APPCACAO, estimación de producción de cacao que crecerá 15% este año. Diario Gestión, área de Economía. Disponible en: <http://gestion.pe/economia/minagri-estima-que-produccion-cacao-crecera-15-este-ano>.
- Gestión. (2017). Informe técnico sobre cacao Peruano. Diario de economía y negocios especializado. Disponible en: <https://gestion.pe/economia/cacao-peruano-ingresara-mercados-extranjeros-marca-colectiva-kall-kakao-138544>.
- González, A. (2012). Fermentación y evaluación de cacao fino de aroma para los productores del cantón Quinsaloma. Tesis de Maestría, Universidad Politécnica Salesiana, Ecuador. Recuperado de: <http://ojs.unemi.edu.ec/index.php/cienciaunemi/article/view/303>.

- Graziani, L., Ortiz, L., Álvarez, N., Trujillo, A. (2003). Fermentación del cacao en dos diseños de cajas de madera. *Agronomía Tropical*. Recuperado de: [www.Cacao.sian.info.ve/memorias/html/18html](http://www.Cacao.sian.info.ve/memorias/html/18html).
- Guillín, E., y Lara, M. (2010). Efecto de los sistemas de fermentación en la calidad del cacao de la variedad complejo nacional x trinitario (*Theobroma cacao* L.) del Cantón Las Naves, Provincia Bolívar. Tesis Título Ingeniero, Universidad Estatal de Bolívar. Ecuador. Disponible en: <http://www.dspace.ueb.edu.ec/bitstream/123456789/902/1/043.pdf>.
- Gutiérrez, S. (2007). Manual de Prácticas de Control de Calidad de Cacao en Centro de Acopio, Normas técnicas de calidad. APPROCAP – GTZ. Piura, Perú.
- Gutiérrez, M. (2007). Prácticas de Control de Calidad de Cacao en Centro de Acopio. Editorial Castilla. Piura, Perú.
- Gutiérrez, M. (2009). Manual de calidad en centro de acopio, secado y fermentación de cacao. Editorial Castilla. Piura, Perú.
- Gutierrez, H., y De la Vara, R. (2008) Análisis y diseño de experimentos. Editorial Mc Graw Hill. Bogotá Colombia.
- Hall, Tarka, Hurst, Stuart and Adams. (2010). Cacao Residues in Ancient Maya Vessels from Rio Azul, Guatemala. *American Antiquity*, Vol. 55, No. 1 recuperado de: <http://www.heritagedaily.com/2010/08/medicinal-and-ritualistic-uses-for-chocolate-in-mesoamerica>.
- Hekmat, K., & Bauer, H. (2007). Cocoa Avocado Milkshake. Investigación recuperado de: [www.joybauer.com](http://www.joybauer.com) › ... › Food and Recipes for Health Conditions.
- Hernández, R., Fernández, C., y Baptista, P. (2010). Metodología de la Investigación. Editorial Mc Graw Hill. Bogotá, Colombia
- INACAL. (2016). Norma tecnica Peruana ISO 2451. <https://tiendavirtual.inacal.gob.pe>

- Instituto de Normas Técnicas de Costa Rica – INTCR. (2014). Normas Técnicas nacionales e Internacionales para cacao y derivados del cacao. San José, Costa Rica.
- INDECOPI. (2011). NTP-ISO 2451: Granos de Cacao. Especificaciones. Lima – Perú.  
<https://www.inacal.gob.pe/repositorioaps/data/1/1/1/jer/prensa/files/AGROINDUSTRIA.pdf>
- James, W. (2016). Estudio del desperdicio del mucilago de cacao en el cantón Naranjal (Provincia del Guayas). Tesis título Ing. Industrial. Recuperado de:  
<http://revistas.utm.edu.ec/index.php/ECASinergia/article/view/149>
- Jiménez, J. (2003). Efectos de dos Métodos de Fermentación sobre la calidad de tres grupos de cacao (*Theobroma cacao L.*) cultivados en la zona de Quevedo, Provincia de Los Ríos. Tesis Ing. Agr. Guaranda Ecuador, Universidad Estatal de Bolívar.
- Jonfia-Essien, W., West G., Alderson P., Tucker, G. (2008). Phenolic content and antioxidant capacity of hybrid variety cocoa beans. Food Chemistry.
- Kim, H., & Keeney, P. (1984). Epicatechin content in fermented and unfermented cocoa. Journal of Food Science. EE.UU.
- Kuman, N. (2001). Comparative analyses of genetic diversity, cocoa quality and flavour characteristics in selected Papua New Guinea cocoa genotypes. Masters Research thesis, Institute of Land and Food Resources, The University of Melbourne.
- Lachenaud. (1997). Influencia de la fermentación en la calidad del cacao criollo porcelana (*Theobroma cacao L.*) en el Sur del Lago de Maracaibo. Tesis de Maestría. Maracay, Ven. Universidad Central de Venezuela. Facultad de Agronomía.
- Lambert, S., Aitken, W. (2000). Possible influence of cocoa bean testa characteristics on the flavour quality of fermented cocoa beans. 13th international cocoa research conference October 9-14.

- Lambert, S. (2008). Cocoa fermentation - general aspects. Revista Scientiae. Recuperado de:  
[http://www.canacacao.org/uploads/smartsection/19\\_Cocoa\\_fermentation\\_General\\_aspects.pdf](http://www.canacacao.org/uploads/smartsection/19_Cocoa_fermentation_General_aspects.pdf).
- Lefeber, Janssens, Moens, Gobert, & De Vuyst, (2011). Interesting starter culture strains for controlled cocoa bean. Recuperado de:  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21803901>.
- Lemus, M., Graziani de Fariñas, L., Ortiz de Bertorelli, L., Trujillo de Leal, Y.A. (2002). Efecto del mezclado de cacaos tipos Criollo y Forastero de la localidad de Cumboto sobre algunas características físicas de los granos durante la fermentación. Agron. Trop.52 (1). Recuperado de: [file:///D:/dialnet-AtributosFisicosquimicosYSensorialesDeLasAlmendras-5090269%20\(2\).pdf](file:///D:/dialnet-AtributosFisicosquimicosYSensorialesDeLasAlmendras-5090269%20(2).pdf).
- León, J. (2000). Botánica de los cultivos tropicales. Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura.
- Lin, B. (2011). Polyphenols and Neuroprotection against Ischemia and Neurodegeneration. Mini-Reviews in Medicinal Chemistry
- Loayza, W. (2014). Influencia de la frecuencia de remoción, durante la fermentación, en la calidad sensorial del cacao (*Theobroma Cacao*, L.) de Satipo. Tesis Ing. Químico. Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Lima, Perú. Disponible en:  
[http://cybertesis.unmsm.edu.pe/bitstream/cybertesis/3877/1/Loayza\\_lw.pdf](http://cybertesis.unmsm.edu.pe/bitstream/cybertesis/3877/1/Loayza_lw.pdf)
- López, M. (2016). Desarrollo de un Modelo Matemático para la Fermentación del Cacao Criollo Blanco. Tesis para optar el grado de Magister. Facultad de Ingeniería, Universidad de Piura. Piura, Perú.



- Lucia- (2002). Estudio del cacao y evolución en las exportaciones. Ministerio de Agricultura y Riego. Recuperado de: <http://repositorio.iaen.edu.ec/bitstream/24000/4599/1/Lucia%20Rosero.pdf>.
- Martínez, G. (2012), Evaluación de componentes físicos, químicos, organolépticos y del rendimiento de clones universales y regionales de cacao (*Theobroma cacao L.*) en las zonas productoras de Santander, Arauca y Huila”. Tesis Magister en Ciencias Agrarias. Universidad Nacional de Colombia.
- Martínez, G. (2016), Evaluación de componentes físicos, químicos, organolépticos y del rendimiento de clones universales y regionales de cacao (*Theobroma cacao L.*) en las zonas productoras de Santander, Arauca y Huila”. Tesis Magister en Ciencias Agrarias. Universidad Nacional de Colombia.
- Mathews K.C., van Holde E.K., Aher G.K. (2004). Bioquímica. Tercera edición. Pearson Addison Wesley, España. Disponible en: [http://www.fmvz.unam.mx/fmvz/p\\_estudios/texto\\_bioquimica-pdf](http://www.fmvz.unam.mx/fmvz/p_estudios/texto_bioquimica-pdf).
- Meersmana, E., Steensels, J., Paulusa, T., Struyfa, N., Saelsa, V., Mathawan, M., Allegaert, L., Vrancken, G. (2015). Breeding Strategy To Generate Robust Yeast Starter. Recuperado de: <http://aem.asm.org/content/early/2015/06/29/5.full.pdf+html?ijkey=jE33fWG51FxnI&keytype=ref&siteid=asmjournals>.
- Mejía, D. (2012). Cacao: operaciones post-cosecha. FAO. Disponible en: <http://www.fao.org/documents/card/es/c/1fa1c733-4ed9-41e7-a9b0-6d5585ad262e/>.
- Menezes, S., Matos, E., Oliveira, A., Silva, B., Santos, L., Peres, K., Da Silva, A., Pirovani C., Micheli F. (2016). The pathogenesis-related protein PR-4b from *Theobroma cacao* presents RNase activity, Ca<sup>2+</sup> and Mg<sup>2+</sup> dependent- DNase activity and antifungal

- action on *Moniliophthora perniciosa*. *BMC Plant Biol.* 2016.  
<http://www.bdigital.unal.edu.co/61168/1/Estudio%20de%20la%20respuesta/cacao..pdf>
- Meyer, B., B. Biehl, M., Bin Said, R. Samarak. O. (1989). Post-harvest pod storage: A method for pulp preconditioning to impair strong nib acidification during cocoa fermentation in Malaysia. *J. Sci. Food Agric.*
- Ministerio de agricultura – MINAG. (2003). Estudio del cacao en el Perú y el mundo. Dirección de desarrollo del cacao. Lima – Perú. Disponible en:  
<http://www.minag.gob.pe>
- Ministerio de agricultura – MINAG. (2009). Cultivo y comercialización del cacao. Dirección estadística Agraria. Lima – Perú. Disponible en: <http://www.minag.gob.pe>.
- Ministerio de agricultura y riego – MINAGRI. (2014). El cultivo del cacao. Dirección de Promoción Agraria. Lima – Perú. Recuperado de:  
<http://www.proyectosperuanos.com/cacao.html>.
- Ministerio de agricultura y riego – MINAGRI. (2017). Competitividad y mercado externo del cacao. Dirección de estadística Agraria. Lima – Perú. Recuperado de:  
<http://www.minagri.gob.pe/Est>.
- Navia, O., y Pazmiño, P. (2012). Mejoramiento de las características sensoriales del cacao CCN51 a través de la adición de Enzimas durante el proceso de fermentación. Tesis de grado. Escuela Superior Politecnica del Litoral. Guayaquil, Ecuador.
- Morales, O., Borda, A., Argandoña, A., Farach, R., Garcia, L., y Lazo, K. (2015). La Alianza Cacao Perú y la cadena productiva del cacao fino de aroma. Ediciones ESAN. Lima – Perú. Disponible en:  
<https://www.esan.edu.pe/publicaciones/2015/08/17/LaAlianzaCacao.PeruBApara20web.pdf>.

- Morales, W., Vallejo, Ch., Sinche, P., Torres, Y., Vera, J., y Anzules, E. (2016). Mejoramiento de las características físico-químicas y sensoriales del cacao CCN51 a través de la adición de una enzima y levadura durante el proceso de fermentación. Investigación, Universidad Técnica Estatal de Quevedo. El Empalme, Ecuador.
- Morillo, M. (2005). Alternativas de industrialización de cacao (*Theobroma cacao l.*) Nacional fino o de aroma en el cantón Pangua provincia de Cotopaxi. Tesis. Ing. Industrialización de Alimentos. Universidad Quito, Ecuador.
- Natividad, R., Adriazola, J., García, L., Zavala, J., Gil, J., Cabezas, O., Gonzáles, F. (2007). Investigación: Cultivos industriales tropicales: café, cacao y palma aceitera. UNAS. Tingo María, Perú.
- Nadaroglu, G., Honalki, Y., & Kalr, T. (2010). Were also utilized for biosynthesis of pectinase. The substrate specificity was also reported for polygalacturonases from *Mucor circinelloides*. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4724355/pdf>.
- Navia, A., y Pazmiño, N. (2012). Mejoramiento de las características sensoriales del cacao CCN-51 a través de la adición de enzimas durante el proceso de fermentación. Tesis Ing. de alimentos. Guayaquil, Ecuador. Escuela Superior Politécnica del Litoral.
- Niemenak, N., Rohsius, C., Elwers, S., Ndoumoua, D., Liebereib, R. (2006). Comparative study of different cocoa (*Theobroma cacao L.*) clones in terms of their phenolics and anthocyanins contents. *J Food Composition Analysis*. Recuperado de: [www.scielo.br/pdf/cta/v35n2/0101-2061-cta-35-2-279.pdf](http://www.scielo.br/pdf/cta/v35n2/0101-2061-cta-35-2-279.pdf)
- Nielsen, D., Teniola, O., Ban-Koffi, L., Owusu, M., Andersson, T., and Holzapfel, W. (2008). The Microbiology of Ghanaian Cocoa Fermentations Analysed Using Culture-Dependent and Culture-Independent Methods. *International Journal of Food Microbiology*. Recuperado de: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1567-1364.2008.00405.x/full>.

- Norma Técnica Peruana NTP-ISO 2451. (2016). Granos de cacao. Especificaciones. INACAL (Instituto nacional de calidad). Cuarta edición.
- Ortega, N., Romero, M., Macia, A., Reguant, J., Angles, N., Morello, J., Motilva, M. Obtention and characterization of phenolic extracts from. [https://www.researchgate.net/.../27318985\\_Efecto\\_del\\_Tostado\\_Sobre\\_los\\_Metabolito](https://www.researchgate.net/.../27318985_Efecto_del_Tostado_Sobre_los_Metabolito).
- Ortiz, L., G. Camacho L., & Graziani, F. (2004). Efecto del secado al sol sobre la calidad del grano fermentado de cacao. *Agronomía Trop.*
- Osman, H., Nasarudin, R., Lee, S. (2004). Extracts of cocoa (*Theobroma cacao* L.) leaves and their antioxidation potential. *Food Chemistry*.
- Palacios, A. (2008). Establecimientos de Parámetros (físicos, Químicos y Organolépticos) para diferenciar y valorizar el cacao (*Theobroma cacao* L.) producido en dos zonas identificadas al Norte y Sur del litoral Ecuatoriano. Tesis grado de Magister. Universidad Técnica De Manabí. Santa Ana. Manabí. Ecuador. Disponible en: <http://www.ruta.org/CDOC-Deployment/documentos/establecimientos>.
- Palomino, V., y Aquino, Y. (2017). Calidad del cacao (*Theobroma cacao* L) fermentado en módulo trapezoidal rotativo – mecanizado en tres zonas productoras de Selva Central. Tesis pa Título Ing. En Alimentos. Universidad Nacional Daniel Alcides Carrión. Chanchamayo, Perú
- Petrenko, O. (2004). Estudio de algunas características de las cepas de levaduras y de su rendimiento celular utilizando un medio de cultivo a base de suero lácteo. Tesis doctoral, Universidad Belgrano. Buenos Aires, Argentina.
- Portillo, B. (2012). Efecto del tratamiento poscosecha sobre el desarrollo de las características fisicoquímicas del cacao criollo porcelana del estado Zulia. Tesis de grado Magister. Universidad de Zulia. Maracaibo, Venezuela.

- Portillo, L.; Graziani, L.; Cros, E. (2006). Efecto de algunos factores postcosecha sobre la calidad sensorial del cacao criollo porcelana (*Theobroma cacao* L.). Investigación. Disponible en: [Scielo\serial\fagro\v23n1 \body\art\\_05.htm](http://scielo.fagro.v23n1.body/art_05.htm) 20/06/2006.
- Portillo, E.; Graziani, L.; Betancourt, E. (2007). Análisis Químico del Cacao Criollo Porcelana (*Theobroma cacao* L.) en el Sur del Lago de Maracaibo. Rev. Fac. Agron.
- Prado, L., y Zambrano, M. (2015). Caracterización del proceso de fermentación del cacao variedad nacional mediante el uso de técnicas moleculares y de detección de compuestos de aroma. Tesis para título de Ing. De Alimentos. Universidad tecnológica de Guayaquil. Ecuador
- Prust, C., Hoffmeister, M., Liesegang, H., Wiezer, A., Fricke, W. F., Ehrenreich, A., Gottschalk, G. and Deppenmeier, U. (2005) Secuencia Completa del Genoma de la Bacteria de Ácido Acético *Gluconobacter oxydans*. Rev. Nature Biotechnology.
- Puerta, Q. (2009). Efecto de enzima pectolítica en la remoción del mucílago de *Coffea Arábica* L., según el desarrollo del fruto. Investigación en Cenicafé. Colombia. Disponible en: [http://www.cenicafe.org/es/publications/arc060\(04\)291-312.pdf](http://www.cenicafe.org/es/publications/arc060(04)291-312.pdf).
- Ramírez, M., Romero-Cortés, T., Robles-Olvera, V. (2013). Fermentación del Cacao: Microorganismos Esenciales para el Desarrollo del Aroma y Sabor del Chocolate. Editorial. Editorial Academica Española. Madrid, España.
- Ramos, R. (2013). Atributos fisicoquímicos y sensoriales de las almendras de quince clones de cacao Nacional (*Theobroma cacao* L) en el Ecuador. Investigación. Recuperado de: <https://search.proquest.com/openview/4ef3af6f2c4df278d2cd102155c6d83c/1?pq-origsite=gscholar&cbl=2032480>
- Ramos, G. (2004). La Fermentación, el Secado y Almacenamiento del Cacao. In Taller Internacional de Calidad Integral de cacao, Teoría y Práctica (15-17 nov. / 2004). INIAP – Quevedo, Ecuador.

- Recalde, A. (2007). Evaluación del efecto del procesado y tiempo de la fermentación en los contenidos de Polifenoles, alcaloides y ácidos volátiles en dos genotipos de cacao. Tesis Dr. Químico. Universidad Central del Ecuador. Facultad de Ciencias Químicas. Quito.
- Redgwell, R., Trovato, V., Merinat, S., Curti, D., Hediger, S., & Manez, A. (2003). Dietary fibre in cocoa shell: characterisation of component polysaccharides. *Food Chemistry*, 81.
- Riera, M. (2009). Evaluación de tecnologías para la fermentación del cacao beneficiado CCN-51 (*Theobroma cacao* L). Tesis de grado Magister. El Salvador. Recuperado de: <https://es.scribd.com/doc/157905210/tesis.pdf>.
- Ríos, C. (2012). Evaluación del proceso de fermentación tradicional y no tradicional de la semilla de cacao *Theobroma cacao* L, del ecotipo acriollado, por la determinación de factores físicos - químico y microbiológicos, utilizando cuatro medios de cultivos y levadura *Saccharomyces cerevisiae* como iniciador de fermentación en el método no tradicional. Recuperado de [http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/3.0/deed.es\\_ES](http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/3.0/deed.es_ES).
- Rivera, Mecías, Guzmán, Peña, Medina, Casanova Barrera y Nivelá (2012). Efecto del tipo y tiempo de fermentación en la calidad Física y química del cacao (*Theobroma cacao* L.) Tipo nacional. Escuela Superior Politécnica Agropecuaria de Manabí Manuel Félix López. Calceta, Manabí, Ecuador.
- Rodríguez, C. (2011). Estudio de compuestos volátiles de *Theobroma cacao* ., durante el proceso tradicional de fermentación, secado y tostado”. Tesis para optar el grado de Doctor en Ciencias en Alimentos. Instituto Politécnico Nacional. México, D. F. Recuperado en: <http://www.repositoriodigital.ipn.mx/bitstream/handle/123456789/8918/Tesiss%20Jacobo%20Rodr%C3%ADguez-Vol%C3%A1tiles%20cacao.pdf?sequence=1>.

- Romero, C. (2016). Estudio del Cacao en el Perú y el mundo. Dirección de distribución de cultivos de cacao. MINAGRI. Recuperado de: [agroaldia.minagri.gob.pe/biblioteca/download/pdf/.../estudio\\_cacao\\_para\\_iica.pdf](http://agroaldia.minagri.gob.pe/biblioteca/download/pdf/.../estudio_cacao_para_iica.pdf).
- Rusconi, M., Conti, A. (2010). *Theobroma cacao* L., the Food of the Gods: A scientific approach beyond myths and claims. *Pharmacol Res.* USA.
- Romero, C. (2016). Estudio del Cacao en el Perú y el Mundo, Situación Actual y Perspectivas en el Mercado Nacional e Internacional al 2015. DGPA (MINAGRI) – DEA. Lima, Perú.
- Sánchez, A., Castellanos, O., y Dominguez, K. (2008). Mejoramiento de la poscosecha del cacao a partir del roadmapping. Investigación. Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, Colombia.
- Sánchez P. (2007). Caracterización de sistema de producción de *Theobroma cacao* L., Ministerio de Agricultura y Cría. Fondo Nacional de Investigación Agropecuaria. Miranda, Venezuela.
- Sánchez, V. (2007). Caracterización organoléptica del cacao (*Theobroma cacao* L.), para la selección de árboles con perfiles de sabor de interés comercial. Tesis Ing. Agronómico. Quevedo, Ecuador. Universidad técnica estatal de Quevedo.
- Sarmiento, A., y Herrera, J. (2003). Obtención y caracterización de un banco de levaduras con potencial y aplicación probiótica. Tesis de grado de magister. Pontificia Universidad Javeriana. Bogotá, Colombia.
- Schramm, D., Wang, J., Holt, R., Ensunsa, J., Gonsalves, J., Lazarus, S., Schmitz, H., German, J., and Keen, C. (2001). Chocolate procyanidins decrease the leukotriene-prostacyclin ratio in humans and human aortic endothelial cells. *Revista Am J Clin Nutr*, 73. USA.

- Schwan , W. (2004). The microbiology of cocoa fermentation and its role in chocolate quality. Crit Rev Food Sci Nutr. Recuperado de: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15462126>
- Schilling, R., Regalado, L. (2009). Manual para el Manejo de Cosecha, postcosecha y clasificación de cacao. Para cacao de tipo genético: Trinitario y Forastero. Fermentación en Cajas Rohan. Secado en secadora solar y secadora mecánica de leña. Honduras.
- Sinche, E. (20011). Evaluación del tiempo de fermentación del grano de cacao criollo (*Theobroma cacao L.*), para la obtención de la pasta. Tesis de Título Ing. En Ciencias Agrarias. UNCP. Satipo, Perú.
- Singleton V., and Rossi J. (2001) Determination of phenolic composition and antioxidant activity in fruits, rhizomes and leaves of the white strawberry. Journal of Food Composition and Analysis. California, EE.UU.
- Suazo, C. (2012). Efecto de la fermentación y el tostado Sobre la concentración polifenólica y Actividad antioxidante de cacao Nicaragüense. Tesis de grado Máster en Tecnología y calidad en industrias Agroalimentarias. Universidad Pública de Navarra. Pamplona, España.
- Teneda W. (2016). Mejoramiento del proceso de fermentación del cacao. Editorial universidad Internacional de Andalucía. España. Recuperado de: [file:///C:/Users/Antonio/Downloads/2016\\_978-84-7993-319-7%20\(2\).pdf](file:///C:/Users/Antonio/Downloads/2016_978-84-7993-319-7%20(2).pdf)
- UNCTAD. 2014. Convenio Internacional del Cacao, 2010. Disponible en:: [http://www.icco.org/about-us/international-cocoa-agreements/cat\\_view/2-icco-agreements-and-their-history/3-2010-international-cocoa-agreement.html](http://www.icco.org/about-us/international-cocoa-agreements/cat_view/2-icco-agreements-and-their-history/3-2010-international-cocoa-agreement.html).
- Vallejo, C., Párraga, D., Morales, W., Macías, J., y Ramos R. (2003). Atributos físicos-químicos y sensoriales de las almendras de quince clones de cacao nacional



- (*Theobroma cacao* L.) en el Ecuador. Investigación. Recuperado de:  
[http://www.uteq.edu.ec/revistacyt/publico/archivos/C2\\_en%20construccion.pdf](http://www.uteq.edu.ec/revistacyt/publico/archivos/C2_en%20construccion.pdf)
- Vega, E., y Christie, M. (2012). El caso de la Cooperativa Agraria Industrial Naranjillo (Coopain): expresión de biocomercio en el Perú. Tesis para optar el grado de Magíster. Pontificia Universidad Católica del Perú- Lima, Perú.
- Vera, J., Vallejo, C., Párraga, D., Morales, W., Macías, J., Ramos, R. (2014). Atributos físicos-químicos y sensoriales de las Almendras de quince clones de cacao nacional (*Theobroma cacao* l.) en el Ecuador. Quevedo-Los Ríos.
- Verdesoto, P. (2009). Caracterización química preliminar de cacao (*Theobroma cacao*) de los municipios de Omoa y La Masica, Honduras. Ing. en Agroindustria Alimentaria. Zamorano-Ho.
- Vilchez, N. (2016). Efecto del material del fermentador, en el grado de fermentación de granos de cacao (*Theobroma cacao* L) clon CCN – 51. Tesis de grado Magister. Universidad Nacional de San Martín. Tarapoto, Perú. Recuperado de:  
<http://repositorio.unsm.edu.pe/handle/UNSM/2550>.
- Visioli, F., & Davalos, A. (2011). Polyphenols and Cardiovascular Disease: A Critical Summary of the Evidence. Mini-Reviews in Medicinal Chemistry. USA. Recuperado de: <https://books.google.com.pe/books?isbn=0128135735>.
- Vriens, H. (2010). Healthy chocolate. Baking & Snack International (July--Sept.). Nigeria. Recuperado de: <https://www.barry-callebaut.com/.../high-flavanol-chocolate-confi.pdf>.
- Wacher R. (2011). Microorganismos y chocolates. Revista Digital Universitaria. Universidad Autónoma de México, México.
- Wakao, H. (2002). Estudio de la variación del contenido de alcaloides en cacao (*Theobroma cacao* L.) de producción nacional, durante el proceso de beneficio. Tesis de

Licenciatura en ciencias químicas, Quito: Pontificia Universidad Católica del Ecuador,  
Facultad de ciencias exactas.

Wollgast, J., & Anklam, E. (2000). Review on polyphenols in *Theobroma cacao*: Changes in composition during the manufacture of chocolate and methodology for identification and quantification. *Food Research International*.

Yoshima M., & Ito Y. (2002). Decrease of astringency of Cocoa beans by an Enzymatic Treatment, *Nippon Shokuchin Kagaku Kogaku Kaishi*. Recuperado de: [www.scielo.br/pdf/babt/v47n4/21203.pdf](http://www.scielo.br/pdf/babt/v47n4/21203.pdf)

Zapata, Tamayo y Alberto (2013). Efecto de la fermentación sobre la actividad antioxidante de diferentes clones de cacao colombiano. Investigación. Universidad Nacional de Colombia. Medellín, Colombia.

## **ANEXOS**

## ANEXO 1: FICHAS DE EVALUACION DEL CACAO

### 1A: Ficha de evaluación física de los granos de cacao fermentado

IX CONCURSO NACIONAL DE CACAO

*"El Buen Chocolate Nace En El Campo Peruano"*


IX CONCURSO NACIONAL DE CACAO			
ANALISIS FISICO DE CACAO EN GRANO		CODIGO: .....	
ANALISIS DE LABORATORIO			
I ETAPA	1 PRUEBA	2 PRUEBA	PROMEDIO
Humedad:			
II ETAPA			
Calibre (Peso en 100 granos)			
Olor			
Color			
III ETAPA	1 PRUEBA	2 PRUEBA	TOTAL
DEFECTOS FISICOS			
Grano Germinado			
Grano Plano			
Grano Múltiple			
Grano Partido			
PRUEBA DE CORTE			
Grano Mohoso			
Grano Atacado o dañado por insecto			
TOTAL DE DEFECTOS			
GRADO DE FERMENTACION			
Grano Pizarroso			
Grano Violeta			
Grano Parcialmente Violeta			
OBSERVACIONES			
CALIFICACION		SI CALIFICA ( )	NO CALIFICA ( )
ELABORADO POR :		FECHA:	

# 1B: Ficha de evaluación sensorial de los granos de cacao fermentado

X CONCURSO NACIONAL DE CACAO

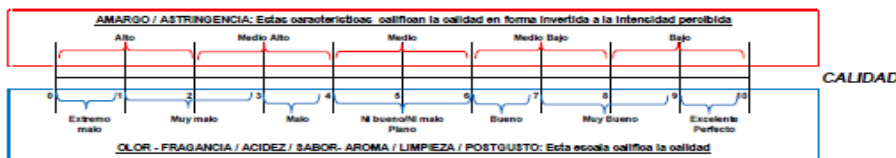
"El Buen Chocolate Nace En El Campo Peruano"

## FICHA DE ANÁLISIS SENSORIAL DE CACAO


 Catador: \_\_\_\_\_  
 Muestra: \_\_\_\_\_ Fecha: \_\_\_\_\_



1. OLORES / FRAGANCIA		Intensidad Alto: _____ Medio: _____ Bajo: _____	Calidad 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	Calidad <input style="width: 100%; height: 20px;" type="text"/>	
2. ACIDEZ		Intensidad Alto: _____ Medio: _____ Bajo: _____	Calidad 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	Calidad <input style="width: 100%; height: 20px;" type="text"/>	
3. AMARGOR		Intensidad Alto: _____ Medio: _____ Bajo: _____	Calidad 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	Calidad <input style="width: 100%; height: 20px;" type="text"/>	
4. ASTRINGENCIA		Intensidad Alto: _____ Medio: _____ Bajo: _____	Calidad 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	Calidad <input style="width: 100%; height: 20px;" type="text"/>	
5. SABOR / AROMA		Intensidad Alto: _____ Medio: _____ Bajo: _____	Calidad 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	<input style="width: 30px; height: 20px;" type="text"/> X 2 = Calidad <input style="width: 100%; height: 20px;" type="text"/>	
6. LIMPIEZA		Intensidad Alto: _____ Medio: _____ Bajo: _____	Calidad 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	Calidad <input style="width: 100%; height: 20px;" type="text"/>	
7. POST-GUSTO		Intensidad Alto: _____ Medio: _____ Bajo: _____	Calidad 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	Calidad <input style="width: 100%; height: 20px;" type="text"/>	
COMENTARIOS		Puntaje del catador 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10			Calidad <input style="width: 100%; height: 20px;" type="text"/>
				Puntaje Total <input style="width: 100%; height: 20px;" type="text"/>	



CALIFICACION: Se requiere el uso de la escala inferior.  
 PUNTAJE: Puntaje mínimo 0, máximo 10.  
 RECOMENDACIONES: Llevar a cabo en medio refrigerado.  
 COMENTARIOS Y SUGERENCIAS: cacao@rbc@gmail.com

### CALIFICACION DE MUESTRAS SEGÚN PUNTAJE

PUNTAJE	CALIFICACION	DESCRIPCION
0 - 20	CACAO PÉSIMO	Cacao con deficiencias, presenta defectos sensoriales
21 - 50	CACAO CORRIENTE	Cacao sin atributos distintivos, sus características aromáticas son de poca intensidad
51 - 70	CACAO DE CALIDAD	Cacao de buena calidad, características aromáticas buenas
71 - 90	CACAO ESPECIAL	Cacao que presenta atributos sensoriales distintivos, con características de aroma finas y de gran intensidad

## ANEXO 2: CARACTERÍSTICAS FISICOQUÍMICAS DURANTE EL PROCESO DE FERMENTACIÓN

### 2A: Características fisicoquímicas del Tratamiento L1

Tiempo (Hr)	Temperatura	pH mus	pH grano	Ac. Ti (mus)	Ac. Ti (grano)	Humedad	°Brix mus	Brix coti	Alcohol (%)	aci. Acet (%)	Color
0	25.4	4.5	7.5	1.28	0.32	44.10	17.1	0.00	0.0	0.0	púrpura
12	26.0	3.9	7.4	1.22	0.35		16.0	0.00	0.2	0.1	púrpura
24	27.5	3.6	7.2	1.15	0.38	36.85	14.0	0.0	0.6	0.3	violeta
36	29.4	4.2	6.5	0.90	0.42		11.0	0.0	1.2	0.5	violeta
48	31.5	5.0	5.3	0.51	0.45	36.10	7.0	0.0	2.6	1.2	viol-marrón
60	34.1	5.0	5.1	0.58	0.38		4.0	0.0	6.1	2.0	viol-marrón
72	36.8	5.0	4.6	0.58	0.32	35.80	1.0	0.0	10.0	3.0	marrón morad
84	40.7	4.9	4.6	0.51	0.38		0.5	0.0	6.8	3.8	marrón morad
96	45.3	4.9	4.6	0.51	0.38	35.70	0.0	0.0	5.2	5.5	marrón morad
108	45.7	4.7	4.7	0.58	0.45		0.0	0.0	3.9	6.3	marron bajo
120	41.1	4.6	4.6	0.58	0.58		0.0	0.0	2.8	7.8	marron bajo
132	39.2	4.5	4.5	0.64	0.64		0.0	0.0	2.1	8.9	marron media
144	37.8	4.5	4.5	0.70	0.70	35.20	0.0	0.0	1.5	10.1	marron

## 2B: Características fisicoquímicas del Tratamiento L2

Tiempo (Hr)	Temperatura	pH mus	pH grano	Ac. Ti (mus)	Ac. Ti (grano)	Humedad	°Brix mus	Brix coti	Alcohol (%)	aci. Acet (%)	Color
0	25.4	4.5	7.5	1.28	0.29	42.75	17.1	0.0	0.0	0.0	purpura
12	26.0	3.9	7.4	1.22	0.35		14.2	0.0	0.2	0.1	púrpura
24	27.0	3.5	7.2	1.18	0.38	35.90	11.5	0.0	0.7	0.3	violeta
36	29.2	4.0	7.0	0.83	0.38		6.5	0.0	1.4	0.8	violeta
48	30.5	5.0	6.8	0.58	0.42	35.32	4.4	0.0	3.3	1.8	viol-morado
60	30.4	4.9	6.2	0.32	0.38		2.0	0.0	4.5	2.5	viol-morado
72	32.8	4.8	5.0	0.51	0.45	35.00	1.0	0.0	6.9	2.8	viol-morado
84	37.2	4.8	4.9	0.64	0.51		0.5	0.0	10.2	3.9	viol-morado
96	43.6	4.7	4.8	0.77	0.70	35.00	0.0	0.0	5.2	5.3	marron-viol
108	45.4	4.7	4.8	0.77	0.77		0.0	0.0	4.5	8.1	marron-viol
120	39.8	4.6	4.6	0.70	0.70		0.0	0.0	3.7	10.3	marron-viol
132	42.8	4.6	4.6	0.70	0.70		0.0	0.0	3.0	10.9	marrón
144	38.0	4.5	4.5	0.70	0.70	35.55	0.0	0.0	2.6	11.3	marrón

## 2C: Características fisicoquímicas del Tratamiento LE1

Tiempo (Hr)	Temperatura	pH mus	pH grano	Ac. Ti (mus)	Ac. Ti (grano)	Humedad	°Brix mus	Brix coti	Alcohol (%)	aci. Acet (%)	Color
0	25.4	4.5	7.5	1.28	0.29	41.98	17.1	0.0	0.0	0.0	purpura
12	27.0	3.9	7.0	1.22	0.32		15.0	0.0	0.3	0.1	púrpura
24	28.0	3.6	6.8	1.18	0.45	36.00	11.0	0.0	0.9	0.3	violeta
36	29.0	4.1	6.2	0.90	0.38		6.0	0.0	1.6	0.9	violeta
48	29.8	5.0	5.0	0.58	0.35	35.55	4.0	0.0	3.0	2.0	viol-morado
60	30.8	5.1	4.8	0.54	0.35		2.0	0.0	5.1	2.8	viol-morado
72	33.1	4.6	4.7	0.51	0.38	35.50	1.0	0.0	10.1	3.9	viol-morado
84	40.3	4.7	4.7	0.51	0.38		0.0	0.0	9.4	5.2	viol-morado
96	43.6	4.7	4.7	0.45	0.38	35.40	0.0	0.0	7.5	8.6	marron-viol
108	46.1	4.8	4.8	0.38	0.32		0.0	0.0	6.8	8.9	marron-viol
120	40.3	4.8	4.8	0.51	0.45		0.0	0.0	5.9	9.6	marron-mora
132	37.8	4.5	4.5	0.64	0.64		0.0	0.0	3.7	10.2	marrón
144	37.3	4.5	4.5	0.77	0.77	35.36	0.0	0.0	2.6	10.8	marrón

## 2D: Características fisicoquímicas del Tratamiento LE2

Tiempo (Hr)	Temperatura	pH mus	pH grano	Ac. Ti (mus)	Ac. Ti (grano)	Humedad	°Brix mus	Brix coti	Alcohol (%)	aci. Acet (%)	Color
0	25.4	4.5	7.5	1.28	0.29	42.75	17.1	0.0	0	0	purpura
12	27.5	3.8	7.3	1.25	0.32		13.5	0.0	0.3	0.1	púrpura
24	27.8	3.5	7.2	1.15	0.38	36.80	11.0	0.0	0.7	0.3	violeta
36	28.3	4.5	6.0	0.90	0.38		8.0	0.0	1.5	0.8	viol-morado
48	29.3	5.2	5.1	0.77	0.35	36.34	6.0	0.0	2.7	1.8	viol-morado
60	32.5	4.9	4.9	0.70	0.35		3.0	0.0	5.0	2.5	morado
72	37.5	4.6	4.7	0.64	0.32	35.40	2.0	0.0	9.9	3.7	morado
84	40.7	4.6	4.7	0.64	0.38		1.0	0.0	9.2	5.0	morado
96	42.5	4.6	4.8	0.64	0.45	35.40	0.0	0.0	7.2	8.4	marron-mora
108	45.1	4.7	4.8	0.61	0.51		0.0	0.0	6.5	8.6	marron-mora
120	42.0	4.7	4.7	0.58	0.58		0.0	0.0	5.6	9.5	marron-mora
132	41.1	4.4	4.4	0.51	0.51		0.0	0.0	3.3	10.0	marrón
144	37.7	4.4	4.4	0.51	0.51	35.30	0.0	0.0	2.6	10.5	marrón

## 2E: Características fisicoquímicas del Tratamiento E1

Tiempo (Hr)	Temperatura	pH mus	pH grano	Ac. Ti (mus)	Ac. Ti (grano)	Humedad	°Brix mus	Brix coti	Alcohol (%)	aci. Acet (%)	Color
0	25.4	4.5	7.5	1.28	0.29	43.35	17.1	0.0	0.0	0.0	purpura
12	25.7	4.1	7.3	1.09	0.32		16.0	0.0	1.1	0.5	púrpura
24	27.0	3.8	7.1	1.06	0.38	37.35	15.0	0.0	2.0	1.0	viol-morado
36	28.3	4.3	6.8	1.02	0.42		7.0	0.0	3.8	2.0	viol-morado
48	30.0	5.0	6.6	0.96	0.45	36.70	3.0	0.0	4.5	2.8	morado
60	33.5	4.9	6.1	0.90	0.45		1.0	0.0	7.1	3.5	morado
72	35.1	4.6	4.6	0.90	0.51	36.52	0.0	0.0	11.1	5.1	morado
84	38.1	4.8	4.7	0.77	0.51		0.0	0.0	10.2	6.2	marrón-mora
96	41.9	4.9	4.9	0.58	0.45	36.50	0.0	0.0	6.4	8.8	marrón-mora
108	47.3	4.6	4.6	0.51	0.51		0.0	0.0	4.9	9.5	marron-chocol
120	41.3	4.6	4.6	0.64	0.64		0.0	0.0	4.1	10.1	marrón
132	35.5	4.5	4.5	0.70	0.70	36.40	0.0	0.0	2.8	11.4	marrón



2F: Características fisicoquímicas del Tratamiento E2

Tiempo (Hr)	Temperatura	pH mus	pH grano	Ac. Ti (mus)	Ac. Ti (grano)	Humedad	°Brix mus	Brix coti	Alcohol (%)	aci. Acet (%)	Color
0	25.4	4.5	7.5	1.28	0.29	42.51	17.1	0.0	0	0	purpura
12	25.8	4.1	7.3	1.09	0.32		16.0	0.0	1.2	0.5	púrpura
24	26.6	3.8	7.1	1.06	0.35	36.45	14.0	0.0	2.2	1.2	púrpura
36	27.7	4.5	5.8	0.83	0.38		8.0	0.0	4.1	2.4	viol-morado
48	30.5	5.0	4.9	0.83	0.45	35.95	2.0	0.0	4.8	3.0	viol-morado
60	37.5	4.7	4.8	0.80	0.45		1.0	0.0	7.5	3.7	morado
72	39.8	4.6	4.6	0.77	0.51	35.70	0.0	0.0	11.4	6.2	morado
84	42.3	4.8	4.6	0.70	0.54		0.0	0.0	10.1	7.1	marron-mora
96	43.6	4.9	4.8	0.64	0.58	36.15	0.0	0.0	6.6	9.2	marron-mora
108	48.1	4.8	4.8	0.51	0.58		0.0	0.0	4.7	10.1	marron-chocol
120	42.2	4.8	4.8	0.58	0.64		0.0	0.0	3.9	11.1	marron-chocol
132	35.1	4.5	4.5	0.64	0.64	36.10	0.0	0.0	2.8	12.1	marrón

2G: Características fisicoquímicas del Tratamiento T

Tiempo (Hr)	Temperatura	pH mus	pH grano	Ac. Ti (mus)	Ac. Ti (grano)	Humedad	°Brix mus	Brix coti	alcohol (%)	aci. Acet (%)	Color
0	25.4	4.5	7.5	1.28	0.29	42.95	17.1	0.0	0.0	0.0	purpura
12	25.9	4.3	7.3	1.09	0.32		16	0.0	0.2	0.1	púrpura
24	26.8	4.2	7.1	0.80	0.38	36.95	15	0.0	0.6	0.4	violeta
36	27.8	4.6	6.1	0.70	0.42		10	0.0	1.5	0.9	violeta
48	29.7	5.1	5.1	0.64	0.45	36.45	7	0.0	3.5	2.0	viol-morado
60	29.6	4.8	4.9	0.58	0.51		4	0.0	4.7	2.8	viol-morado
72	32.0	4.5	4.6	0.54	0.38	36.32	2	0.0	6.9	3.1	morado
84	37.1	4.6	4.7	0.51	0.45		1	0.0	10.5	4.0	morado
96	41.7	4.6	4.7	0.51	0.48	36.20	0	0.0	6.2	5.6	marron-mora
108	42.3	4.7	4.7	0.54	0.51		0	0.0	4.2	8.2	marron-mora
120	48.0	4.7	4.7	0.58	0.58		0	0.0	3.4	10.1	marron-chocol
132	41.3	4.6	4.6	0.64	0.64		0	0.0	3.0	10.6	marrón
144	40.9	4.6	4.6	0.64	0.64	36.10	0	0.0	2.8	11.5	marron

ANEXO 3: Grado de fermentación del cacao

Tiempo de ferment	L1					L2					LE1					LE2				
	pizarra	mohos	Violeta	Ferment. Parcial	% de ferment	pizarra	mohos	Violeta	Ferment. Parcial	% de ferment	pizarra	mohos	Violeta	Ferment. Parcial	% de ferment	pizarra	mohos	Violeta	Ferment. Parcial	% de ferment
96	15	0	17	12	56	7	0	28	31	34	5	0	25	23	47	9	0	23	21	47
120	7	0	9	8	76	5	0	12	23	60	2	0	17	11	70	7	0	16	14	63
144	3	0	7	4	86	1	0	9	6	84	0	0	2	1	97	2	0	1	2	95
Seco	2	0	6	4	88	1	0	8	5	86	0	0	0	2	98	1	0	0	1	98

Tiempo de ferment	E1					E2					T				
	pizarra	mohos	Violeta	Ferment. Parcial	% de ferment	pizarra	mohos	Violeta	Ferment. Parcial	% de ferment	pizarra	mohos	Violeta	Ferment. Parcial	% de ferment
96	6	0	21	18	55	10	0	17	19	54	6	0	24	20	50
120	4	0	12	13	71	8	0	11	14	67	4	0	16	11	69
144	2	0	7	3	88	2	0	1	6	91	3	0	5	2	90
Seco	2	0	4	3	91	1	0	0	5	94	3	0	4	2	91

ANEXO 4: Análisis de varianza del grado de fermentación

4A: Análisis de Varianza para *granos pizarra*

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
Tratamiento	8.857	6	1.4762	2.58	0.120
Error	4.000	7	0.5714		
Total (corregido)	12.857	13			

Todas las razones-F se basan en el cuadrado medio del error residual

4B: Análisis de Varianza para *granos violeta*

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
Tratamiento	95.428	6	15.904	31.81	0.0001
Error	3.5	7	0.5		
Total (corregido)	98.928	13			

Todas las razones-F se basan en el cuadrado medio del error residual

4C: Tabla ANOVA para *fermentación parcial*

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
Tratamientos	25.428	6	4.238	19.78	0.0005
Error	1.5	7	0.214		
Total (Corregido.)	26.928	13			

Todas las razones-F se basan en el cuadrado medio del error residual

4D: Tabla ANOVA para *% de fermentación*

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
Tratamientos	206.857	6	34.476	68.95	0.0001
Error	3.5	7	0.5		
Total (Corregido)	210.357	13			

Todas las razones-F se basan en el cuadrado medio del error residual

### ANEXO 5: Evaluación sensorial de cacao

Catadores	OLOR/FRAGANCIA							
	Tratamientos							Total
	LI	L2	LE1	LE2	E1	E2	T	
1	7	8	7	6	8	8	8	52
2	7	7	7	7	8	9	8	53
3	7	8	8	7	8	9	8	55
<b>Total</b>	<b>21</b>	<b>23</b>	<b>22</b>	<b>20</b>	<b>24</b>	<b>26</b>	<b>24</b>	<b>160</b>
Promedio	7.0	7.7	7.3	6.7	8.0	8.7	8.0	

Catadores	ACIDEZ							
	Tratamientos							Total
	LI	L2	LE1	LE2	E1	E2	T	
1	7	8	6	7	8	8	8	52
2	7	8	7	8	8	9	8	55
3	7	7	8	7	9	9	7	54
<b>Total</b>	<b>21</b>	<b>23</b>	<b>21</b>	<b>22</b>	<b>25</b>	<b>26</b>	<b>23</b>	<b>161</b>
Promedio	7.0	7.7	7.0	7.3	8.3	8.7	7.7	

Catadores	AMARGOR							
	Tratamientos							Total
	LI	L2	LE1	LE2	E1	E2	T	
1	7	7	7	7	8	9	8	53
2	7	7	7	8	9	9	8	55
3	8	7	8	7	9	9	8	56
<b>Total</b>	<b>22</b>	<b>21</b>	<b>22</b>	<b>22</b>	<b>26</b>	<b>27</b>	<b>24</b>	<b>164</b>
Promedio	7.3	7.0	7.3	7.3	8.7	9.0	8.0	

Catadores	ASTRINGENCIA							
	Tratamientos							Total
	LI	L2	LE1	LE2	E1	E2	T	
1	6	6	7	7	8	8	9	51
2	6	7	7	7	8	9	8	52
3	7	7	8	8	8	8	8	54
<b>Total</b>	<b>19</b>	<b>20</b>	<b>22</b>	<b>22</b>	<b>24</b>	<b>25</b>	<b>25</b>	<b>157</b>
Promedio	6.3	6.7	7.3	7.3	8.0	8.3	8.3	

Catadores	SABOR/AROMA							
	Tratamientos							Total
	LI	L2	LE1	LE2	E1	E2	T	
1	12	16	14	14	18	18	16	108
2	12	16	14	16	16	18	16	108
3	14	14	14	14	16	18	18	108
<b>Total</b>	<b>38</b>	<b>46</b>	<b>42</b>	<b>44</b>	<b>50</b>	<b>54</b>	<b>50</b>	<b>324</b>
Promedio	12.7	15.3	14.0	14.7	16.7	18.0	16.7	

Catadores	LIMPIEZA							
	Tratamientos							Total
	LI	L2	LE1	LE2	E1	E2	T	
1	10	10	8	10	10	10	10	68
2	10	10	9	10	10	10	10	69
3	10	10	8	10	10	10	10	68
<b>Total</b>	<b>30</b>	<b>30</b>	<b>25</b>	<b>30</b>	<b>30</b>	<b>30</b>	<b>30</b>	<b>205</b>
Promedio	10.0	10.0	8.3	10.0	10.0	10.0	10.0	

Catadores	POST GUSTO							
	Tratamientos							Total
	LI	L2	LE1	LE2	E1	E2	T	
1	8	7	6	8	9	9	8	55
2	7	8	7	8	9	9	8	56
3	7	7	7	8	9	9	9	56
<b>Total</b>	<b>22</b>	<b>22</b>	<b>20</b>	<b>24</b>	<b>27</b>	<b>27</b>	<b>25</b>	<b>167</b>
Promedio	7.3	7.3	6.7	8.0	9.0	9.0	8.3	

Catadores	PUNTAJE DE CATADOR							
	Tratamientos							Total
	LI	L2	LE1	LE2	E1	E2	T	
1	7	8	7	8	8	8	9	55
2	7	7	7	8	8	9	8	54
3	7	7	7	8	9	9	9	56
<b>Total</b>	<b>21</b>	<b>22</b>	<b>21</b>	<b>24</b>	<b>25</b>	<b>26</b>	<b>26</b>	<b>165</b>
Promedio	7.0	7.3	7.0	8.0	8.3	8.7	8.7	

ANEXO 6: DESCRIPCIÓN DE ATRIBUTOS SENSORIALES

<b>Tratto.</b>	<b>olor/fragancia</b>	<b>acidez</b>	<b>amargor</b>	<b>astringencia</b>	<b>sabor/aroma</b>	<b>Limpieza</b>	<b>Post gusto</b>
L1	Nueces, herbal, frutal	cítrico, toronja dulce	medio	Medio alto	Guindones, nueces, toronja dulce	Limpio	Frutal, toronja dulce
L2	Frutal, manzana	Cítrico, toronja, manzana dulce	medio	medio	Limón dulce, nuez, pecanas, canela	Limpio	Durazno, toronja dulce
LE1	Láctico, madera, frutal	láctico, frutal	Bajo	Bajo	Nueces, láctico, guindones	Limpio ligero	Láctico, durazno dulce
LE2	láctico, avena, frutal	cítrico ligero, toronja	bajo	bajo	nueces, ligero cítrico, guindones	Limpio ligero	dulce durazno, nuez
E1	cítrico, ligero floral	cítrico, almendra	regular	regular	cítrico, manzana, ligeramente a guindones y nueces	Limpio	Cítrico dulce, durazno, chocolate
E2	Frutal, nueces, ajonjolí	cítrico, limón dulce	bajo	bajo	Nueces, ajonjolí, cítrico dulce, panela, chocolate	Limpio	Frutal, nueces, durazno, chocolate
T	fruta cítrica madura	cítrico, limón dulce	bajo	bajo	Limón dulce, frutos maduros, guindones dulces	Limpio	Frutal dulce, durazno

ANEXO 7: ANALISIS DE VARIANZA DE LOS ATRIBUTOS SENSORIALES DE LOS  
TRATAMIENTOS EN ESTUDIO DEL CACAO FERMENTADO

7A: Análisis de Varianza para atributo *olor/fragancia*.

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
A:Tratamientos	6.5	6	1.08333	4.44	0.0136
B:Catadores	1.154	2	0.577381	2.37	0.1361
Error	2.928	12	0.244048		
Total (corregido)	10.666	20			

CV: 6.44 %

Todas las razones-F se basan en el cuadrado medio del error residual

7B: Análisis de Varianza para atributo *Acidez*.

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
A:Tratamientos	7.66484	6	1.27747	5.85	0.0047
B:Catadores	0.712454	2	0.356227	1.63	0.2363
Error	2.62088	12	0.218407		
Total (corregido)	10.9524	20			

CV: 6.12 %

Todas las razones-F se basan en el cuadrado medio del error residual

7C: Análisis de Varianza para atributo *Amargor*.

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
A:Tratamientos	10.7546	6	1.79243	11.84	0.0002
B:Catadores	0.516484	2	0.258242	1.71	0.2229
Error	1.81685	12	0.151404		
Total (corregido)	13.2381	20			

CV: 4.99 %

Todas las razones-F se basan en el cuadrado medio del error residual

7D: Análisis de Varianza para atributo *astringencia*.

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
A:Tratamientos	11.3864	6	1.89774	7.15	0.0020
B:Catadores	0.481685	2	0.240842	0.91	0.4295
Error	3.18498	12	0.265415		
Total (corregido)	15.2381	20			

CV: 6.88 %

Todas las razones-F se basan en el cuadrado medio del error residual

7E: Análisis de Varianza para atributo *Sabor/aroma*

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
A: Tratamientos	73.8828	6	12.3138	13.82	0.0001
B: Catadores	0.311355	2	0.155678	0.17	0.8417
Error	10.6886	12	0.89072		
Total (corregido)	84.9524	20			

CV: 6.04 %

Todas las razones-F se basan en el cuadrado medio del error residual

7F: Análisis de Varianza para atributo *Limpieza*

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
A:Tratamientos	4.51648	6	0.752747	2.82	0.0594
B:Catadores	0.302198	2	0.151099	0.57	0.5817
Error	3.1978	12	0.266484		
Total (corregido)	7.80952	20			

CV: 5.28%

Todas las razones-F se basan en el cuadrado medio del error residual



7G: Análisis de Varianza para atributo *Post gusto*

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
A:Tratamientos	13.7363	6	2.28938	8.80	0.0008
B:Catadores	0.129121	2	0.0645604	0.25	0.7841
Error	3.12088	12	0.260073		
Total (corregido)	16.9524	20			

CV: 6.41 %

Todas las razones-F se basan en el cuadrado medio del error residual

7H: Análisis de Varianza para atributo *Puntaje de catador*

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
A:Tratamientos	8.99817	6	1.49969	5.47	0.0061
B:Catadores	0.129121	2	0.0645604	0.24	0.7936
Error	3.28755	12	0.273962		
Total (corregido)	12.5714	20			

CV: 6.66%

Todas las razones-F se basan en el cuadrado medio del error residual

## ANEXO 8: FICHA DE LA LEVADURA *Saccharomyces cerevisiae*



**Caja 9 Kg**

### LEVADURA INSTANTÁNEA, Masas Dulces

#### MODO DE EMPLEO:



Incorporar la Levadura Instantánea Fleischmann® con la harina e ingredientes secos.

Evitar contacto directo con el agua fría, hielo o con las paredes de las amasadoras refrigeradas,

#### DOSIS:

Se sugiere de 1 a 5 g por kilogramo de harina, dependiendo del tiempo de fermentación y temperatura ambiente.

1 kg de Levadura Instantánea equivale aproximadamente a 3 kg de Levadura Fresca,

#### CONSERVACIÓN:

Conservar en un lugar fresco, seco y aislado del suelo.  
No requiere refrigeración.

#### VIDA ÚTIL:

En su envase original hasta por 2 años.  
Una vez abierta, mantenga en refrigeración.

#### PRESENTACIÓN:

Caja con 20 paquetes de 450 g c/u.  
Contenido neto: 9 kg

#### CÓDIGOS:

##### CÓDIGO EAN



##### CÓDIGO DUN



## ANEXO 9: FICHA TÉCNICA DE LA ENZIMA PECTINOLITICA



AB Enzymes GmbH Germany

# ROHAPECT® PTE

## DESCRIPCIÓN Y ESPECIFICACIONES

### DESCRIPCIÓN

ROHAPECT PTE® es una preparación especial de enzimas pectolíticas para el procesamiento de frutas y verduras. La pectinasa se deriva del *Aspergillus*.

### LAS PROPIEDADES

El producto tiene las siguientes características:

- a) los productos líquidos
- b) de color marrón con olor aromático
- c) peso específico: ~ 1,15 g / ml

### ACTIVIDAD

ROHAPECT PTE® contiene una actividad declarada mínimo de 75 PTF / mg.

PTF 1 / mg corresponde una actividad de la enzima, lo que conduce a un aumento de la extinción de 0,01 después 1 min., A un pH de 5,8 y 30 ° C a 235 nm en una solución de pectina de 0,5%.

### APLICACIÓN

ROHAPECT PTE® es un preparado de enzima especial que contiene principalmente los específicos pectin transeliminasa o actividad endo pectin liasa.

La degradación de la pectina se produce por el patrón sin transeliminativa desesterificación anterior.

ROHAPECT® PTE actúa perfectamente para una rápida reducción de la viscosidad en el procesamiento de frutas y verduras.

ROHAPECT® PTE actúa en el café desprendiendo de manera más rápida el musilágeno, liberando aromas y Facilitando el lavado.

En la semilla de Cacao controla la fermentación, logrando que el ph se mantenga.

En la producción de fruta aguardiente el tratamiento enzimático proporciona una mejor fermentación, sin formación adicional de metanol. Para el procesamiento de jugo de zanahoria, el tratamiento aumenta la rendimiento de los jugos y colorantes.

## ROHAPECT<sup>®</sup> PTE

### DOSIS

APLICACION	CONDICIONES DE REACCION	DOSAJE
Jugos cítricos (Naranja, uva de fruta)	10 - 25 ° C, 10-20 min	0.5 a 1 g/100kg
La pulpa lavada de cítricos	30 a 45 ° C 10 a 30 min	2 a 4 g/100 kg
Granos Despulpados de Café,	A temperatura ambiente 25 – 40° C	5 a 10 g / 100 kg.
Granos de Cacao (controla la fermentación, para conservar el grado de acidez, se mantiene el ph)	A temperatura ambiente X spray	20 g / ton
Frutas aguardientes: Peras, Las cerezas, ciruelas, etc.	masa: a temperatura ambiente, durante la fermentación	3 – 6 g/100kg
Jugo de Zanahoria	masa: 45 - 50 ° C, 1 a 2 horas	10g / 100 kg
Puré de concentrados, es decir, mango, plátano, maracuyá, albaricoques, melocotones, etc.	35 a 55 ° C, 10 - 20 min	2 a 4g /100 kg

### PRESENTACIÓN

Disponible en Bidones de 25 Kg.

Almacenamiento

Guardar en un lugar frío (4°C) la pérdida de actividad será menos de 10% dentro de un año.

### SEGURIDAD

Evite la forma de aerosol y del producto en polvo. La inhalación de aerosol de la enzima o polvo puede causar sensibilización, causan reacciones del tipo alérgicas en los individuos sensibilizados. Para la información detallada por favor refiérase a la Hoja de Datos de Seguridad Material (MSDS).

ANEXO 10: FOTOGRAFIAS



10 A: Planta de cacao



10 B: Ecotipos de cacao criollo



10 C: Cacao desconchado



10 D: Ecotipos de cacao criollo



10 E: Medida física de granos frescos de cacao



10 F: Materiales y equipos de control



10 G: Tratamientos en fermentación



10 H: evaluación de la fermentación



10 I: Fermentación a las 24 horas



10 J: Fermentación a las 48 horas



10 K: Fermentación a los 72 horas



10 L: Fermentación a las 132 horas



0 LL: Inicio de la fermentación



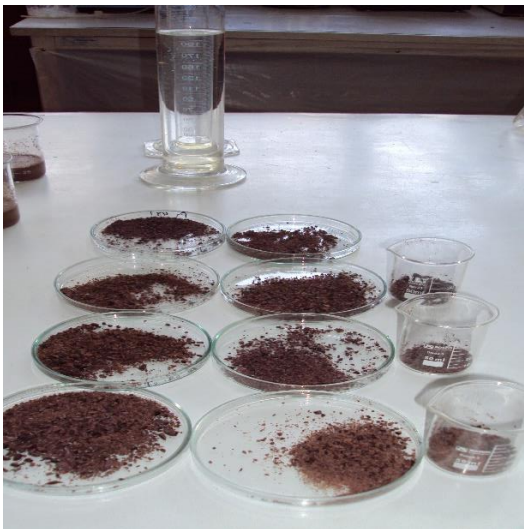
10 M: Determinación de acidez



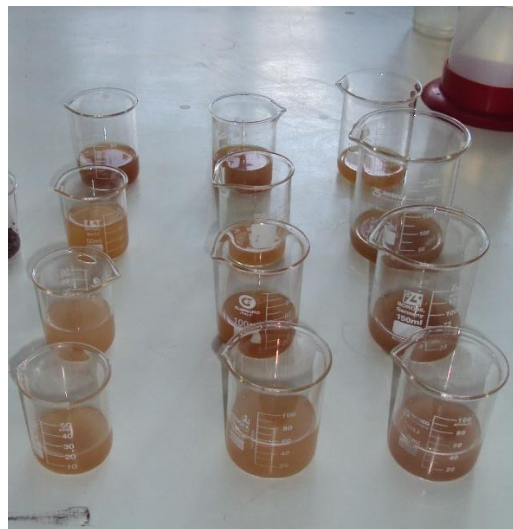
10 N: Muestras al final de fermentación



10 Ñ: Muestras al final de fermentación



10 O: Muestras para diversos análisis



10 P: Alícuotas para diversos análisis



10 Q: Determinación de grado de fermentación



10 R: Secado de granos de cacao



10 R: Secado de granos de cacao



10 S: Evaluación de humedad



10 T: Tratamientos en evaluación física



10 U: Evaluación física





10 V: Guillotina para prueba de corte



10 W: Tabla de evaluación de fermentación



10 X: Grado de fermentación



10 X: Grado de fermentación



10 Y: Tratamientos tostados



10 Z: Tostado de las muestras



10 AA: Molienda para datación



10BB: Muestras para catación



10 CC: Cámara de cultivo para pruebas microbiologicos



10 DD: Prueba de humedad



10 EE: Determinación de cenizas



10 FF: Cenizas de tratamientos