

UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR
FACULTAD DE QUIMICA Y FARMACIA



ESTANDARIZACION DEL PROCESO DE FERMENTACION DE LA MEZCLA
DE SEMILLAS DE TRES ACCESIONES DE *Theobroma cacao* L. (CACAO)
DEL CULTIVAR SAN JOSE DEL REAL DE LA CARRERA UBICADA EN EL
DEPARTAMENTO DE USULUTAN.

TRABAJO DE GRADUACION PRESENTADO POR

CESAR AMILCAR ALAS RIVERA.

ARGENTINA DEL SOCORRO MORALES SOLORZANO.

PARA OPTAR AL GRADO DE
LICENCIADO (A) EN QUIMICA Y FARMACIA.

SEPTIEMBRE, 2015

SAN SALVADOR, EL SAVADOR, CENTROAMERICA

UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR

RECTOR

ING. MARIO ROBERTO NIETO LOVO

SECRETARIA GENERAL

DRA. ANA LETICIA ZA VALETA DE AMAYA

FACULTAD DE QUIMICA Y FARMACIA

DECANA

LICDA. ANABEL DE LOURDES AYALA DE SORIANO

SECRETARIO

LIC. FRANCISCO REMBERTO MIXCO LOPEZ

COMITE DE TRABAJO DE GRADUACION

DIRECTORA GENERAL

Licda. María Concepción Odette Rauda Acevedo

ASESORAS DE AREA DE ANALISIS DE ALIMENTOS: QUIMICA AGRICOLA

MSc. Ena Edith Herrera Salazar

MAE. María Elisa Vivar de Figueroa

DOCENTES DIRECTORAS

Dra. Vianney Castañeda de Abrego

MSc. Amy Elieth Morán Rodríguez

Licda. Ana Ingrid Morazán Chávez

AGRADECIMIENTOS

A nuestros docentes directores, Dra. Vianney Castañeda de Abrego, Msc. Amy Elieth Morán Rodríguez y Licda. Ana Ingrid Morazán Chávez por su orientación, paciencia y dedicación en el desarrollo de esta tesis.

A la directora general Licda. María Concepción Odette Rauda Acevedo y a las docentes asesoras de área MAE. María Elisa Vivar de Figueroa y Msc. Ena Edith Herrera Salazar por sus observaciones y orientación en esta tesis.

Al cultivar San José del Real de la Carrera, por el apoyo y colaboración de todo el personal involucrado en la realización de esta tesis.

A CENSALUD, por abrirnos sus puertas y proporcionarnos los laboratorios e instrumentos necesarios para efectuar los análisis de nuestra tesis.

A todo el personal de CENSALUD, por brindarnos su colaboración en el desarrollo de esta tesis.

César Amílcar Alas Rivera

Argentina del Socorro Morales Solórzano

DEDICATORIAS

A Dios por llenarme de muchas bendiciones al darme una familia que me apoya y me dan fuerza para vencer los obstáculos y los problemas que se han presentado desde el principio de mi vida.

A mi padre Evaristo Alas Rivas un hombre de pocas palabras pero de un apoyo muy especial y que aún que ya no estés presente físicamente yo sé que siempre nos estarás cuidando y brindando tu apoyo.

A mi madre Reina Iris Rivera Guzmán de Alas por todo el esfuerzo, comprensión y sacrificio que me da para lograr formarme como persona y a nivel profesional.

César Amílcar Alas Rivera

DEDICATORIAS

A Dios Todopoderoso, por darme fortaleza y permitirme culminar mi carrera.

A mi padre, Prudencio Antonio Solórzano (Q.D.D.G), por sus consejos de superación académica y apoyo financiero hasta culminar mi educación media, fundamental para el ingreso a la educación superior.

A mi madre, Elvira Galdámez Morales, por su ayuda incondicional, cuidado de mi hijo en el tiempo de estudio en la universidad, y financiera para el desarrollo de mi carrera.

A mi hermano, Marvin Alberto Morales Solórzano, por sus consejos, apoyo emocional cuando algunos momentos se tornaban difíciles y financiero durante mis años en la universidad y desarrollo de mi tesis.

A mi hijo, Josías Jerónimo Hernández Morales, por su cariño, amor, y ser mi inspiración y un motivo más para superarme siempre.

A mi facultad por formarme en esta profesión y por el conocimiento valioso que me proporcionó.

Muchas gracias.

Argentina Morales

INDICE

Abreviaturas

Resumen

Capítulo I

1.0 Introducción xxvi

Capítulo II

2.0 Objetivos

Capítulo III

3.0 Marco teórico 31

3.1 Historia del cacao 31

3.2 El cacao en El Salvador siglos XX y XXI 32

3.3 El cacao en el mundo 33

3.4 Potencial agroindustrial 33

3.5 El cacao 34

3.6 Composición química de la semilla de cacao 36

3.7 Beneficio de cacao 37

3.7.1 Recolección de la semilla 37

3.7.2 Desgrane 38

3.7.3 Proceso de fermentación de cacao 39

3.7.4 Lavado de las semillas de cacao 41

3.7.5 Secado de las semillas de cacao	42
3.7.6 Molienda de las semillas de cacao	42
3.7.7 Elaboración de licor de cacao y chocolate	42
3.7.8 Perfil sensorial del cacao	43
3.8 Principales características de microorganismos involucrados en la fermentación	44
3.8.1 Bacterias acéticas	44
3.8.2 Hongos	45
3.8.3 Levaduras	45
3.8.4 Bacterias lácticas	45
3.8.4.1 Lactobacillus	46
3.8.5 Bacterias aerobias	46
3.9 Medios utilizados para el recuento de microorganismos	46
3.9.1 Bacterias acéticas	46
3.9.2 Hongos y levaduras	47
3.9.3 Bacterias lácticas	48
3.9.4 Bacterias aerobias	48
3.10 Índice de fermentación	49
Capítulo IV	
4.0 Diseño metodológico	51

4.1 Tipo de estudio	51
4.2 Investigación bibliográfica	51
4.3 Investigación de campo	51
4.3.1Recolección de la muestra	52
4.3.2 Almacenamiento y manejo de la muestra	52
4.4 Proceso de fermentación	52
4.5 Monitoreo de temperatura y pH	54
4.6 Recolección de muestras de fermentación para recuento de microorganismos	55
4.7 Recuento de microorganismos	55
4.8 Identificación de microorganismos	56
4.8.1 Morfología macroscópica	57
4.8.2 Morfología microscópica	57
4.8.2.1 Preparación de frotis bacteriano	57
4.8.2.2 Tinción de gram	58
4.9 Índice de fermentación	58
4.9.1 Tiempo de fermentación de las semillas de cacao	59
4.10. Desviación estándar	59
Capítulo V	
5.0 Resultados y discusión	61
5.1 Clasificación de frutos recolectados	61

5.2 Ensayo 1	64
5.2.1 Proceso de fermentación	64
5.2.2 Peso y número de semillas por fruto	64
5.2.3 Monitoreo de temperatura	67
5.2.4 Medición de pH	69
5.2.5 Índice de fermentación	70
5.2.6 Recuento de microorganismos	73
5.3 Ensayo 2	77
5.3.1 Proceso de fermentación	77
5.3.2 Tamaño de los frutos	77
5.3.3 Peso y número de semillas por fruto	79
5.3.4 Monitoreo de temperatura	82
5.3.5 Medición de pH	84
5.3.6 Índice de fermentación	85
5.3.7 Recuento de microorganismos	87
5.4 Ensayo 3	90
5.4.1 Proceso de fermentación	90
5.4.2 Pesos y números de semillas por fruto	90
5.4.3 Monitoreo de temperatura	92
5.4.4 Medición de pH	94
5.4.5 Índice de fermentación	95
5.4.6 Recuento de microorganismos	109

5.5 Ensayo 4	112
5.5.1 Proceso de fermentación	112
5.5.2 Monitoreo de temperatura	113
5.5.3 Medición de pH	115
5.5.4 Índice de fermentación	117
5.5.5 Recuento de microorganismos	127
5.6 Identificación de microorganismos	132
5.6.1 Identificación de colonias de bacterias acéticas	132
5.6.1.1 Medio carbonato de calcio	132
5.6.1.2 Medio RAE	133
5.6.2 Identificación de colonias de hongos y levaduras	133
5.6.2.1 Medio agar papa dextrosa	133
5.6.3 Identificación de colonias de bacterias lácticas	134
5.6.3.1 Medio MRS	134
5.6.4 Identificación de colonias de bacterias aerobias	135
5.6.4.1 Medio plate count	135
5.7 Tinción de gram	136
5.7.1 Hongos y levaduras	136
5.7.2 Bacterias lácticas	137
5.7.3 Bacterias acéticas	138
5.7.4 Bacterias aerobias	138

Capítulo VI

6.0 Conclusiones	141
------------------	-----

Capítulo VII

7.0 Recomendaciones	144
---------------------	-----

Bibliografía

Glosario

Anexos

INDICE DE ANEXOS

Anexo N°

1. Origen de las importaciones de cacao
2. Proceso general de fermentación
3. Determinación del índice de fermentación
4. Lecturas obtenidas de temperatura y pH, tomadas a la muestra que contiene el recipiente fermentador.
5. Esquema de recolección de muestras fermentadas
6. Esquema de recuento de microorganismos
7. Medios y reactivos utilizados para la identificación de bacterias fermentadoras
8. Fotografías de muestras de semillas de cacao durante el proceso de fermentación
9. Listado de material, equipo y reactivos utilizados en los ensayos del proceso de fermentación
10. Ubicación del cultivar de la Carrera ubicada en Usulután
11. Cálculo del porcentaje, por tipo de cacao, utilizados en cada mezcla
12. Tablas de ensayo N° 1
13. Tablas de ensayo N° 2
14. Tablas de ensayo N° 3
15. Tablas de ensayo N° 4
16. Carta de entrega de ejemplar de investigación

INDICE DE CUADROS

CUADRO N°	N° pág.
1. Mezclas de semillas de cacao para ensayo 1 y su codificación	54
2. Medios de cultivos, temperaturas y tiempos de incubación por microorganismo	56
3. Microorganismos y morfologías de sus colonias	57
4. Microorganismo y su morfología microscópica	58
5. Clasificación del cacao según color, forma y rugosidad del fruto	61
6. Muestras de tipos de frutos de cacao analizados en ensayo 1	64
7. Mezclas formadas a partir de los frutos de la tabla N°1	66
8. Mezclas para toma de índice de fermentación	71
9. Muestras por tipos de cacao analizadas en ensayo 2	77
10. Tamaño de frutos por tipo de cacao ensayo 2	78
11. Mezclas de tipos de cacao formadas a partir de los frutos recolectados	81
12. Mezclas de tipos de cacao estudiadas ensayo 3	90
13. Semillas fermentadas mezcla 1 ensayo 3	98
14. Fermentación de semillas mezcla 2 ensayo 3	99

15. Semillas fermentadas mezcla 3 ensayo 3	100
16. Muestra semillas fermentadas mezcla 4 ensayo 3	101
17. Semillas fermentadas mezcla 5 ensayo 3	102
18. Fermentación de semillas mezcla 6 ensayo 3	103
19. Semillas fermentadas mezcla 7 ensayo 3	104
20. Muestra fermentación de semillas mezcla 8 ensayo 3	105
21. Mezcla 7 ensayo 3 fermentada	106
22. Fermentación de mezcla 8 ensayo 3	108
23. Mezclas de tipos de cacao recolectadas ensayo 4	112
24. Semillas fermentadas mezcla 1.1 y 1.2 ensayo 4	119
25. Fermentación de semillas Mezclas 2.1 y 2.2 ensayo 4	120
26. Mezclas 3.1 y 3.2 de semillas fermentadas ensayo 4	121
27. Semillas fermentadas mezclas 3.1 y 3.2 ensayo 4	122
28. Fermentación de mezclas 1.1 y 1.2 ensayo 4	124
29. Mezclas 3.1 y 3.2 fermentadas ensayo 4	126

INDICE DE FIGURAS

FIGURA. N°	N° Pág.
1. Frutos de cacao, distribución de de las semillas en placentación axial	34
2. Cacao criollo, trinitario y forastero	35
3. Resultados obtenidos de temperatura de las mezclas fermentadas en ensayo 1	68
4. Resultados de pH en las mezclas de fermentación ensayo 1	69
5. Resultados obtenidos de índice de fermentación en las mezclas del ensayo 1	72
6. Recuento de microorganismos de la mezclas 1 a la 6 de bacterias lácticas, acéticas, aerobias, hongos y levaduras ensayo 1	75
7. Resultados de temperatura de las mezclas de fermentación ensayo 2	83
8. Resultados de pH de las mezclas en fermentación ensayo 2	84
9. Resultados de índice de fermentación en las mezclas ensayo 2	86
10. Recuento de microorganismos en las mezclas para bacterias lácticas, acéticas, aerobias, hongos y levaduras	

ensayo 2	88
11. Resultados de temperatura de las mezclas de fermentación ensayo 3	93
12. Resultados de pH de las mezclas en fermentación ensayo 3	95
13. Resultados de índice de fermentación en las mezclas ensayo 3	96
14. Recuento de microorganismos de la mezclas de bacterias acéticas, lácticas, aerobias, hongos y levaduras ensayo 3	109
15. Resultados de temperatura de las mezclas de fermentación ensayo 4	114
16. Resultados de pH en las muestras de fermentación ensayo 4	116
17. Resultados de índice de fermentación de las mezclas de fermentación ensayo 4	118
18. Placas de cultivo con microorganismos presentes en el proceso de fermentación	128
19. Placas con cultivos de microorganismos presentes en el proceso de fermentación	129
20. placas con cultivos de bacterias acéticas presentes en el proceso de fermentación	129

21. Recuento de microorganismos de las mezclas en fermentación de bacterias lácticas, acéticas, aerobias, hongos y levaduras ensayo 4	131
22. Colonias de bacterias acéticas presentes en el proceso de fermentación incubadas en medio carbonato de calcio	132
23. Se observa colonias de bacterias acéticas, presentes en el proceso de fermentación incubadas en medio RAE	133
24. Colonias de hongos y levaduras, presentes en el proceso de fermentación incubadas en medio papa dextrosa	134
25. Resultado de colonias de bacterias ácido láctico, presentes en el proceso de fermentación, incubadas en medio MRS	135
26. Colonias de bacterias aerobias, presentes en el proceso de fermentación, incubadas en medio plate count	136
27. Fotografías que muestran microscópicamente, las levaduras obtenidas durante el proceso de fermentación	137
28. Representa fotografías microscópicas de lactobacilos gram positivos, involucrados en el proceso de fermentación	137
29. Fotografía microscópica de bacterias acéticas, gram positivas, involucradas en el proceso de fermentación	138

30. Se muestra fotografía microscópica de bacterias aerobicas, gram positivas y gram negativas, presentes en el proceso de fermentación

139

INDICE DE TABLAS

TABLA N°	N° pág.
1. Peso promedio de semillas por frutos ensayo 1	65
2. Promedios de temperatura y desviación estándar de las mezclas en fermentación ensayo 1	67
3. Promedio de pH obtenido de las mezclas en fermentación ensayo 1	69
4. Resultados en las mezclas de índice de fermentación ensayo 1	72
5. Número y peso de semillas en frutos ensayo 2	80
6. Promedios de temperatura obtenidos de las mezclas en fermentación ensayo 2	82
7. Promedios de pH obtenidos de las mezclas en fermentación ensayo 2	84
8. Datos de índice de fermentación en las mezclas ensayo 2	86
9. Número y peso promedio de semillas en mezclas del ensayo 3	91
10. Promedios obtenidos de temperatura de las mezclas de fermentación ensayo 3	92
11. Promedios de pH obtenidos de las mezclas en fermentación ensayo 3	94
12. Datos de índice de fermentación obtenidos en las muestras para índice de fermentación ensayo 3	96
13. División de cada mezcla recolectada en dos partes	112
14. Promedios de temperatura obtenidos de las mezclas en fermentación ensayo 4.	113

15. Promedios de pH obtenidos en las mezclas de fermentación ensayo 4	115
16. Resultados de índice de fermentación obtenidos de las mezclas en fermentación ensayo 4.	117

ABREVIATURAS

mL	Mililitro
g	gramo
Mz	Manzanas
TM	Toneladas Métricas
BA	Bacterias Acéticas
RAE	Medio de Ácido Acético-Etanol Rutherford
MRS	Man Rogosa y Sharpe
CaCO ₃	Carbonato de calcio
IF	Índice de fermentación
μm	Micrómetro o micra
Log	Logaritmo
UFC/mL	Unidades formadoras de colonias por mililitro
Mos	Microorganismos

RESUMEN

El presente estudio tuvo como objetivo, estandarizar el proceso de fermentación de la mezcla de semillas de tres accesiones de *Theobroma cacao* L. (cacao) del cultivar San José del Real de la Carrera departamento de Usulután. Para ello se realizó la fermentación de las semillas de cacao durante cinco días, período en el cual se identificaron y cuantificaron los microorganismos involucrados en el proceso de fermentación: bacterias aerobias, lácticas, acéticas, hongos y levaduras, además se determinó pH e índice de fermentación. La identificación de los microorganismos se realizó por tinción de gram observando al microscopio. Los recuentos se realizaron en los medios plate count, papa dextrosa, RAE, carbonato y MRS, obteniendo conteos mayores de bacterias aerobias, hongos y levaduras en los primeros 3 días de fermentación, las bacterias acéticas y lácticas presentaron recuentos mayores los días 4 y 5 de fermentación. También se monitoreó la temperatura y pH, en los recipientes de fermentación, utilizando un pHmetro con termómetro, a partir del día 0 al día 5 de fermentación, se observó que los días 4 y 5 se eleva la temperatura debido al proceso exotérmico generado por los microorganismos presentes en el medio, el pH disminuye en días 4 y 5 de fermentación, debido al crecimiento de las bacterias acéticas y lácticas, que degradaron los alcoholes, generados durante la fermentación, en ácido acético y láctico respectivamente. También se determinó el índice de fermentación, que sirvió para determinar cuántos días se debe fermentar las semillas de cacao, reduciendo con ello los compuestos fenólicos presentes en el cacao y por tanto, reducir la astringencia como resultado de la oxidación de las antocianinas y otros compuestos fenólicos durante este proceso. El índice de fermentación, se realizó tomando muestras de semillas de cacao fermentadas y secas, a partir del día 0 al día 5 de fermentación, estas se trituraron y extrajeron sus componentes con una mezcla de metanol-ácido clorhídrico, en proporciones de 97:3, luego se leyeron las

absorbancias a 530nm y 460nm, en un espectrofotómetro UV/VIS, posteriormente se realizó la relación de las absorbancias, para obtener el índice de fermentación, en los cuatro ensayos, se obtuvieron valores mayores de 1, en el día 5 del proceso, con ello se concluye, que 5 son los días que se debe fermentar, las semillas de cacao, para obtener buenas características en el grano, ya que estudios científicos, realizados en otros países determinan, que valores de 1 o mayores de 1 son los aceptados. (22) (53)

Con los resultados obtenidos se recomienda realizar otros estudios sobre fermentación del cacao en El Salvador incluyendo elaboración de licor de cacao, caracterización molecular de las bacterias involucradas, estudiar más a fondo mezclas controlando pH y temperatura, investigar la probabilidad de utilizar cepas de microorganismos para acelerar la fermentación, con el objeto de conocer más acerca de este proceso.

Este estudio se llevó a cabo de junio a diciembre de 2013, en el Laboratorio de Biotecnología, del Centro de Investigación y Desarrollo en Salud (CENSALUD) de la Universidad de El Salvador.

CAPITULO I
INTRODUCCION

1.0 INTRODUCCION

Hoy en día en El Salvador, se pretende cultivar 13 mil manzanas de cacao, para lo cual se está impulsando dicha producción y sus derivados, con el objetivo de competir en el mercado nacional e internacional y convertir éste en un producto de calidad internacional que tenga aceptación, que cumpla normas y estándares de calidad como parte de la materia prima para la elaboración del chocolate y que sea considerado de buena calidad, es fundamental desarrollar correctamente el proceso de fermentación de las semillas del cacao, ya que en el proceso se logra obtener las características deseadas de color, aroma, sabor y acidez. (36)

Durante el desarrollo del proceso, se encuentran involucrados factores que afectan la calidad del producto final, entre estos se considera la genética del fruto, madurez, cantidad de semillas, temperatura, carga microbiana presente en cada una de las fases de la fermentación, método y tiempo de fermentación.

(4) (5) (15)

En el presente estudio, se estandarizó el proceso de fermentación de semillas de *Theobroma cacao* L. (cacao), del cultivar San José del Real La Carrera ubicada en el departamento de Usulután. Con el objetivo de establecer el tiempo que debe durar dicho proceso, para ello se utilizó el índice de fermentación, se determinaron las etapas que se desarrollaron durante el proceso, midiendo temperatura en fondo, centro y parte superior del recipiente de fermentación, se midió el pH con un pHmetro, se cuantificaron e identificaron los microorganismos bacterias aerobias, lácticas, acéticas, hongos y levaduras, presentes en cada una de ellas.

En el proceso experimental se utilizaron las semillas de tres accesiones de *Theobroma cacao* L. (cacao) cacao criollo, trinitario y forastero. Para lo cual se recolectaron entre 2 y 8 frutos de cada accesión, para obtener la cantidad de

semillas necesarias para el proceso. Se fermentaron durante 5 días en depósitos plásticos, monitoreando la temperatura, pH e índice de fermentación cada 24 horas desde el día 0 al día 5.

Cada 24 horas se recolectaron 3 mL de muestra fermentada y se realizó el recuento de microorganismos aerobios, bacterias lácticas, acéticas, hongos y levaduras, presentes en cada etapa del proceso de fermentación. El proceso experimental se desarrolló en el Laboratorio de Biotecnología, del Centro de Investigación y Desarrollo en Salud (CENSALUD) de la Universidad de El Salvador, realizándose cuatro ensayos del proceso de fermentación, en el período de junio a diciembre de 2013.

CAPITULO II

OBJETIVOS

2.0 OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GENERAL

Estandarizar el proceso de fermentación de la mezcla de semillas de tres accesiones de *Theobroma cacao* L. (cacao), del cultivar San José del Real de La Carrera, ubicada en el departamento de Usulután.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 2.2.1. Determinar pH, temperatura e índice de fermentación de las semillas.
- 2.2.2. Identificar los microorganismos presentes en las etapas del proceso de fermentación de semillas de cacao.
- 2.2.3. Cuantificar los microorganismos involucrados en cada etapa del proceso de fermentación de semillas de cacao.
- 2.2.4. Establecer el tiempo necesario de fermentación de las semillas de cacao
- 2.2.5. Entregar un ejemplar de la investigación a la gerencia del cultivar San José del Real de La Carrera en Usulután.

CAPITULO III

MARCO TEÓRICO

3.0 MARCO TEÓRICO

3.1. Historia del cacao

La palabra cacao procede de la lengua azteca “*cacahuatl*”. (17)

Para encontrar el significado de la palabra cacao se recurre a la lengua maya:

- cac, que en lengua maya quiere decir rojo (en referencia al color de la cáscara del fruto). (17)

- cau, que expresa las ideas de fuerza y fuego. (17)

Se sabe que los primeros árboles del cacao crecían de forma natural a la sombra de las selvas tropicales, en las cuencas del Amazonas y del Orinoco, hace ya unos 4000 años. Los mayas empezaron a cultivarlo hace más de 2500 años. (18)

Los aztecas aprendieron de los mayas el cultivo y llamaban “*cacahuatl*” al cacao y “*xocolatl*”, la bebida aromática que se obtenía de sus frutos. Para aquel entonces el “*xocolatl*” era apreciado como reconstituyente que daba fuerza y despertaba el apetito sexual. Las semillas de cacao también se utilizaban como monedas de cambio, costumbre que perduró mucho después de la colonización por los españoles. (10)

Posteriormente el cacao llega al Viejo Continente en 1528, siendo Cortés quien vuelve a España con un cargamento de cacao, además de las recetas y los utensilios necesarios para su preparación.

Fue así como los españoles tomaron la costumbre de consumir la bebida chocolatada, que se convirtió en un verdadero "deleite" el día que le agregaron

azúcar. Religiosas instaladas en México mejoraron la receta al incorporarle vainilla, canela y anís. (18)

El chocolate podía ser un alimento o una bebida. Como bebida se le podía consumir hasta en los días de ayuno lo mismo que el vino y como era mucho más nutritivo, se le prefería hasta en los días de cuaresma. (18)

Por mucho tiempo, el chocolate fue una exclusividad española y como era bastante caro, estaba reservado a las clases sociales privilegiadas. El contrabando, los visitantes de la Corte de España, los intercambios con los conventos y las capturas de naves que volvían de México, fueron los hechos que permitieron que el cacao llegara a otros países. (18)

En España el chocolate lo hacían fermentando las semillas del cacao, secadas al sol, tostadas y prensadas entre dos piedras calientes hasta obtener una pasta aromática moldeada en forma de barras o panes, luego se les agregaba agua, azúcar o miel y especias a elección. La nueva bebida resultaba muy agradable al paladar. (18)

3.2 El cacao en El Salvador siglos XX y XXI

Hace 110 años el cultivo del cacao en El Salvador casi desapareció, a excepción de unas 200 Mz sembradas en el cultivar San José del Real de “La Carrera”, ubicada en el departamento de Usulután; 100 Mz. en distintas fincas pequeñas en el departamento de Sonsonate, como también algunos pocos árboles distribuidos en distintas zonas del país, remanentes de plantaciones antiguas. Todas estas plantaciones han sido manejadas en su gran mayoría con tecnología inadecuada y obsoleta casi en un total abandono. (12)

Además en esta época el cultivo del cacao disminuyó debido a que el Ministerio de Agricultura de los gobiernos de esas épocas, se enfocó más en otros

cultivos, tales como café, caña de azúcar y algodón, debido al nulo interés de investigación y fomento del cultivo del cacao en el país. ⁽¹²⁾

Por todo esto, El Salvador se ha convertido en el mayor importador de semilla de cacao de Centro América, principalmente de los países Nicaragua, Honduras y Guatemala, con una importación de 800 TM por año. Siendo el único país de Centro América que no exporta cacao en semilla (ver anexo N° 1). ⁽¹²⁾

3.3 El cacao en el mundo

En actualidad el mercado de la semilla de cacao se ha convertido en una industria multimillonaria para la producción de chocolate, con 51 países produciendo semillas de cacao en África, Asia, Oceanía y América, quienes en conjunto producen un promedio de 3,500,000 TM anuales. Los mayores compradores de cacao son: Europa un 46% y Norte América un 28% (ver anexo 1). ^{(11) (12)}

3.4 Potencial agroindustrial

A partir de las semillas del cacao se obtienen varios productos, los más importantes son:

Licor de cacao: es la pasta de cacao obtenida después de moler las semillas de cacao fermentado y tostado; uno de los más comunes dentro de la elaboración casera de licor. Es distinguido por su marcado sabor dulce, su suavidad y por ser un ingrediente ideal de postres y café. ⁽²⁵⁾

Cacao en polvo: se compone de la parte del cacao desprovista de su manteca. El cacao en polvo suele tener contenidos grasos por debajo del 20% de manteca de cacao. ⁽²⁵⁾

Chocolate: alimento que se obtiene mezclando azúcar con dos productos derivados de la manipulación de las semillas del cacao: una materia sólida (la pasta de cacao) y una materia grasa (la manteca de cacao). (25)

3.5 El cacao

Nombre científico: *Theobroma cacao* L. (cacao)

El cacao es una planta originaria del continente americano perteneciente a la familia de las esterculiáceas. Es un árbol entre 6 y 10 metros aunque puede alcanzar los 20 metros. En cuanto a su tronco es recto y su corona bastante poblada de hojas simples de colores variados y flores pequeñas de color rosa. Los frutos crecen directamente del tronco y de las ramas más antiguas. Estos son una especie de fruto en baya aunque comúnmente se le denomina mazorca, o vaina en los países productores con forma ovoide, oblonga o esferoide que contiene el recubrimiento de las semillas (también conocidas como habas, granos o almendras) que se encuentran en su interior distribuidas uniformemente en placentación axial en una masa mucilaginosa (oscilan entre 20 a 40 por fruto), esta distribución de las semillas dentro del fruto se puede observar en la figura N° 1. (9) (24)

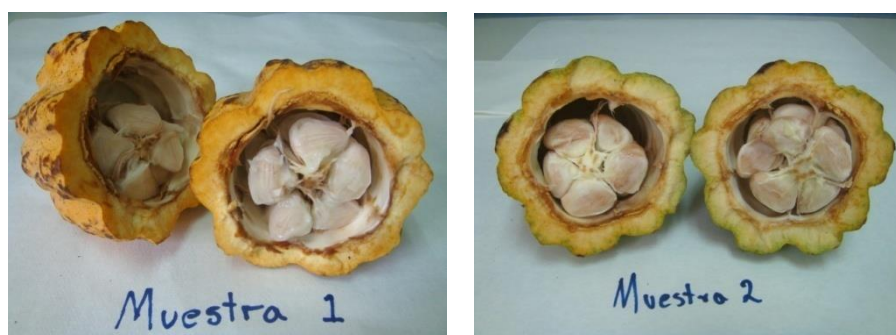


Figura N° 1. Frutos de cacao; distribución de las semillas en placentación axial.

Las formas de cacao se clasifican tradicionalmente en tres grupos genéticos: criollo, forastero y trinitario. El cacao criollo, es fruto de color verde que cambia a amarillo, rugosidad intensa y de forma ovoide; cacao trinitario, fruto de color verde con morado que cambia a amarillo con rojo, rugosidad intermedia y forma oblonga; cacao forastero, de color verde que cambia a amarillo rugosidad ligera y forma esferoide. (24) (9)



Figura N° 2. Cacao criollo, trinitario y forastero

3.6 Composición química de la semilla de cacao

Los principales constituyentes químicos del cacao son: agua, grasas, compuestos fenólicos, materia nitrogenada (proteínas y purinas), almidón y otros carbohidratos. (8)

- Contenido de grasa

La grasa está constituida por glicéridos como el ácido oleico, laurico, palmítico y esteárico. (8)

- Concentración de polifenoles

Los polifenoles de la semilla de cacao se encuentran almacenados en células distribuidas en los cotiledones. Los más abundantes en cacao son metabolitos tipo flavonoides, especialmente tres grupos básicos: catequinas (37%), antocianinas (4%) y proantocianinas (58%). La principal catequina es (-)-epicatequina, que representa cerca del 30% del contenido de polifenoles de la semilla de cacao, la fracción de antocianinas consiste principalmente de cianidina-3-arabinosa y cinaidina-3-D-galactosa y entre las proantocianidinas, las más abundantes son aquellas unidades diméricas, triméricas y oligoméricas de epicatequina y flavan-3,4-diol. Los polifenoles son compuestos que participan en las modificaciones bioquímicas en el interior de la semilla de cacao durante la fermentación. Una de ellas, la oxidación enzimática, causa la disminución del contenido de polifenoles a través de la hidrólisis de las antocianinas y la polimerización de monómeros y oligómeros de flavonoides, transformándolos en compuestos insolubles. Como resultado disminuye la astringencia y amargor mejorando la calidad sensorial del cacao. En semillas violetas este fenómeno es incompleto por lo que el amargor y astringencia se encuentra asociada a una mayor concentración final de polifenoles. Con la fermentación la concentración de polifenoles se reduce a un 40% o más. (8) (38)

- Acidez

El contenido de ácidos orgánicos que aportan acidez al perfil sensorial del cacao, varía entre el 1.2% y 1.6%. Algunos, entre ellos el acético, cítrico y oxálico, se forman durante la fermentación. En los cotiledones el pH desciende desde aproximadamente 6.5 en semillas frescas al inicio de la fermentación hasta valores dentro del rango de 5.0 y 5.5 en semillas fermentadas. (38)

- Teobromina y cafeína

La teobromina y cafeína pertenecen a la familia de las purinas y representan más del 99% de los alcaloides presentes en el cacao. Con la fermentación estos compuestos se reducen entre el 20% y 30% contribuyendo al descenso de amargor de las semillas. (8)

- Carbohidratos

El mucílago es un medio rico para el desarrollo microbiano, contiene alrededor del 14% y 15% de azúcares, de los cuales el 60% es sacarosa y el 39% una mezcla de glucosa y fructosa, además de contener el 90% de agua, 2-3% de pectina 1% - 3% de ácido cítrico y alrededor del 1% de sales minerales. (8)

3.7 Beneficio de cacao

El tratamiento pos cosecha que siguen las semillas de cacao es también conocido como beneficio, y comprende cosecha, desgrane, fermentación, secado, limpieza y almacenamiento. (9) (45)

3.7.1. Recolección de la semilla

La recolección se lleva a cabo dos veces al año, obteniéndose un promedio de 100 a 400 frutos. Se debe tener en cuenta que el rendimiento anual de una planta es de aproximadamente tres kilos de semillas frescas. En el momento de realizar la recolección se deben identificar los frutos maduros, esto se conoce

por los cambios de la coloración externa la cual varía dependiendo del tipo de cacao. (9) (45)

El principal problema, es saber cuando un fruto es apto para su recolección, ya que hay pocas señales que indican que este está maduro. Uno de los principales signos son las coloraciones que presentan. El problema radica en que la variación del color es muy ligera, lo que puede provocar confusión y se corre el riesgo de que no se lleguen a cosechar a tiempo. Otras maneras de saber si están en su adecuada maduración, es el particular sonido que hacen cuando están maduros. La recolección de los frutos es manual y se realiza con un cuchillo curvado unido a un palo que permite alcanzar los frutos más altos. (9) (45)

3.7.2. Desgrane

Antes de partir los frutos es importante separar los sanos y maduros de los que se encuentran dañados o inmaduros, esto con el objeto de evitar el deterioro de la calidad. Los frutos inmaduros no deben seleccionarse para fermentar debido a que contienen semillas duras que no pueden separarse fácilmente y no fermentan porque el mucílago no se ha terminado de formar.

Seleccionado el fruto se procede a cortarlo con la ayuda de un instrumento adecuado. Las semillas se extraen con los dedos y se colocan en un recipiente adecuado, es acostumbrado la utilización de guantes de látex para la realización de esta técnica. (45)

3.7.3. Proceso de fermentación de cacao

La fermentación es una etapa del beneficio del cacao posterior al desgrane, clave para el desarrollo de las principales propiedades sensoriales, y persigue los siguientes objetivos:

- A) La fermentación del mucílago que recubre la semilla de cacao, el cual provocará la eliminación del mismo en su mayoría, así como la formación de componentes ácidos que provocarán la muerte del embrión y evitarán la germinación de la semilla que deteriora su calidad. (4) (5) (45)
- B) El desencadenamiento de las reacciones enzimáticas, que favorecen la reducción de amargor, astringencia del cacao y el desarrollo de sustancias precursoras del aroma característico y sabor del chocolate. (4) (5) (45)
- C) El cambio de coloración del cotiledón, dependiendo de la especie de cacao, al característico color café del chocolate. (4) (5) (45)

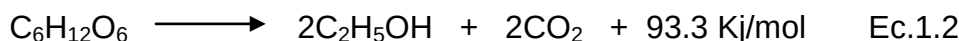
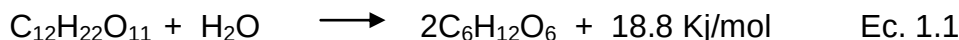
Para iniciar el proceso de fermentación, en primer lugar se deben abrir los frutos, que contienen las semillas de cacao embebidas en la pulpa. Al realizar esta operación, tanto las semillas como la pulpa se encuentran estériles, pero luego ambas se ven contaminadas por una gran variedad de microorganismos provenientes del mismo fruto, de las manos de los manipuladores, de los insectos, de los recipientes usados para el transporte. Las especies encontradas con mayor frecuencia son las levaduras del género *Saccharomyces spp.* (particularmente *S. cerevisiae*, *Candida krusei*, *Kloeckera apiculata*, *Pichia fermentans*, *Hansenula anomala* y *Schizo-saccharomyces pombe*). (15)

La semilla de cacao se encuentra formada por tres secciones principales: un dicotiledón rodeado por una cáscara o testa, que a su vez está cubierta por una

pulpa mucilaginoso. Las semillas de cacao se colocan en recipientes de madera o plásticos para iniciar el proceso de fermentación y es el mucílago quien proporciona el azúcar necesario para el proceso fermentativo. (7)

En el proceso de fermentación se desarrollan dos fases y a continuación se muestran las reacciones químicas que dan lugar a ellas:

- Fase anaerobia (38)



- Fase aerobia (38)



En la fase anaerobia las levaduras fermentan los azúcares presentes en el mucílago dando lugar a la formación de dióxido de carbono y alcohol, posteriormente debido al incremento de la temperatura se da la formación de ácido láctico, la pulpa comienza a desintegrarse y el aire empieza a penetrar. Después de 48 horas aproximadamente inicia la fase aerobia y los alcoholes son oxidados a ácido acético por acción de bacterias acéticas. Estos componentes difunden hacia el cotiledón, donde el componente indispensable es el ácido acético. El ácido acético desempeña un papel importante, en el desarrollo de las sustancias aromáticas, debido a que antes de la fermentación de la materia grasa, forma una película que recubre a las sustancias hidrosolubles, lo que dificulta el contacto enzimas- sustratos. La presencia de acidez ocasiona no solamente la muerte del embrión, también la permeabilización de las membranas del cotiledón, además de provocar una inversión de fase, permitiendo que los glóbulos de la materia grasa que se

encuentren en las sustancias hidrosolubles, sea liberada permitiendo el contacto con las enzimas, para sufrir las diferentes reacciones de hidrólisis, que producen los precursores de aroma. (5) (7) (32) (43)

Asociados con esta última reacción, existe un incremento de temperatura por la naturaleza exotérmica del proceso aerobio, ya que inicialmente se tiene una temperatura ambiente y luego hay un incremento que puede llegar hasta aproximadamente 50°C, influyendo también de manera determinante en los procesos mencionados. La alta temperatura de superficie inducida por este proceso conduce a una disminución en la contaminación microbiana, especialmente en el número de levaduras y de otros hongos. (7) (43)

Es presumible que el ácido acético tiene que difundirse y cubrir en su totalidad el dicotiledón, por lo que se hace necesario evaluar el fenómeno de transporte de este ácido, en su evolución durante todo el proceso de fermentación. Aún con el beneficio que otorga el contenido de ácido acético a las semillas de cacao, esto se convierte en un problema posteriormente en la etapa de secado, cuya finalidad cubre la eliminación de este último componente. (7)

También debido a proceso de fermentación se da la oxidación de los polifenoles presentes en la semilla de cacao reduciendo sabores amargos y astringentes. Los polifenoles se encuentran como metabolitos tipo flavonoides especialmente tres grupos básicos: catequinas, antocianinas y proantocianidinas, proporcionando aroma y sabor a la semilla de cacao. (39) (43)

3.7.4. Lavado de las semillas de cacao

Al finalizar el proceso de fermentación se lavan las semillas para eliminar la pulpa, aunque en algunos casos la fermentación ya la ha desintegrado completamente, por lo que no es necesario el lavado. (36) (43)

3.7.5. Secado de las semillas de cacao

Después del lavado, las semillas son sometidas al secado, para reducirles su contenido de humedad de un 60% a un 8% o menos. Así se asegura una óptima conservación en el almacenamiento y en el transporte. Para ello se utilizan técnicas de secado natural (al sol) o artificial (con secadores mecánicos). Un buen secado evita la formación de hongos, que alteran la manteca de cacao y previniendo la sobre-fermentación. Luego las semillas secas son seleccionadas y clasificadas, se colocan en sacos y se almacenan en lugares secos y ventilados). (36) (43)

3.7.6. Molienda de las semillas de cacao

Esta etapa es llamada procesamiento primario o molienda, cumplida por procesadoras industriales, generalmente fuera de los lugares de producción. Esta etapa persigue la obtención de pasta licor de cacao, manteca de cacao y polvo de cacao. (8) (36)

3.7.7. Elaboración de licor de cacao y chocolate

Las semillas son sometidas a limpieza, liberadas de impurezas, luego son secadas en una estufa, para separar la cáscara y eliminar el germen. La duración, el grado de torrefacción o tostado dependen del origen de las semillas y del producto final deseado. La torrefacción persigue desarrollar los aromas preformados en la fermentación, eliminar los últimos ácidos volátiles, reducir el contenido de agua (de 8% a 2%) y disminuir la población bacteriana. (44) (52)

Una vez enfriadas las semillas son trituradas en pedazos grandes llamados nibs, estos posteriormente, se trituran hasta obtener gránulos muy pequeños, los cuales deben ser molidos, hasta obtener una pasta semilíquida, el grosor de los sólidos suspendidos, en la grasa líquida de cacao, es de

aproximadamente 60 micrones. Una parte de licor obtenido se vierte en cubetas o depósitos adecuados para ello, debiendo refrigerarse por 24 horas para solidificarlo. Luego se desmolda y envuelve en papel aluminio y se empaca en fundas plásticas, teniendo cuidado de identificar correctamente cada muestra, finalmente se guardan a una temperatura de 4 °C, hasta el momento de la degustación. (44) (52)

La otra parte de pasta de cacao semilíquida, debe ser pesada en una balanza digital, para determinar la cantidad de azúcar a utilizar para obtener el chocolate. Las proporciones de pasta de cacao semilíquida y azúcar utilizadas son 70-30 %. (44) (52)

Una vez pesados ambos componentes se muelen en molino o una licuadora hasta obtener una mezcla homogénea, se vierte en recipientes y coloca en el congelador a 4°C hasta el momento de la degustación. (44) (52)

3.7.8. Perfil sensorial del cacao

Sabores básicos

1- Acidez: describe licores con sabor ácido; expresan la presencia de ácidos tales como ácido acético, cítrico y oxálico, este sabor se percibe a los lados y centro de la lengua. Referencias: frutas cítrica, vinagre. (52) (8)

2- Amargor: describe un sabor fuerte y amargo; en respuesta a una falta de fermentación; se percibe en la parte posterior de la lengua o en la garganta, son los polifenoles quienes le proporcionan este sabor al cacao. Referencias: café, cerveza, toronja. (52) (8)

3- Astringencia: describe un sabor fuerte por la falta de fermentación y también son los polifenoles los responsables de proporcionar este sabor a las semillas

de cacao, este sabor se expresa como sequedad en la boca producto de la precipitación de las proteínas en la saliva; va acompañada de un aumento en la salivación; se percibe en toda la boca, lengua, garganta y hasta en los dientes. Referencia: cacao no fermentado, mango verde, hojas de plátano. (52) (8)

4- Dulce: se percibe una sensación dulzaina en la punta de la lengua. (52) (8)

El sabor a chocolate producido después del proceso de fermentación es el resultado de la combinación de 400 a 500 compuestos, incluyendo pirazinas, aldehídos, éteres, tiazoles, fenoles, cetonas, alcoholes, furanos y esterres. (8)

3.8 Principales características de microorganismos involucrados en la fermentación.

3.8.1 Bacterias acéticas

Las bacterias acéticas (BA) son microorganismos gram-negativos, de forma elipsoidal o cilíndrica. Su tamaño varía entre 0.4 -1 μm de ancho y de 0.8 - 4.5 μm de longitud. Son móviles debido a la presencia de flagelos polares o peritricos y poseen un metabolismo aeróbico estricto con el oxígeno como aceptor final de electrones. Presentan actividad catalasa positiva y oxidasa negativa. Referente a su desarrollo, su temperatura óptima de crecimiento es de 25-30°C y su pH óptimo es de 5-6, aunque crecen bien a pH inferiores a 4. (6)

Entre las bacterias acéticas presentes en la fermentación se puede mencionar las siguientes: ***Acetobacter pasteurianus***, ***Acetobacter peroxidans***, ***Acetobacter aceti***, entre otras. (38)

Pruebas de Identificación

Los bacilos gram-negativos son microorganismos catalasa positivos, de forma no esporuladas. Morfología variable (células elípticas o con forma de bastón corto agrupadas en pares o en cadenas), inmóviles o móviles por flagelos. y

poseen un metabolismo estrictamente aerobio con capacidad para crecer en medio ácido, oxidando el alcohol a ácido acético e incluso a CO_2 y H_2O . (6)

3.8.2 Hongos

Son microorganismos eucariotas, poseen un metabolismo aeróbico o anaeróbicos facultativos. Producen colonias algodonosas o lanosas. Algunos presentan filamentos llamados Hifas. (6)

Los hongos encontrados en el proceso de fermentación del cacao son: ***Aspergillus fumigatus***, ***Aspergillus niger***, ***Lasiodiplodia theobromae***, entre otros. (38)

3.8.3 Levaduras

Las levaduras son células microscópicas eucarióticas unicelulares. Morfología variada: esféricas, elípticas, ovaladas, alargadas. Forman colonias húmedas, cremosas, opacas o pastosas. Responsables de la fermentación alcohólica (transformación de azúcar en alcohol + CO_2).

Entre las levaduras presentes en el proceso de fermentación de la semilla de cacao se encuentran: ***Saccharomyces spp.*** ***Saccharomyces cerevisiae***, ***Candida krusei***, ***Kloeckera apiculata***, ***Pichia fermentans***, ***Hansenula anomala*** y ***Schizo-saccharomyces pombe***. (6)

3.8.4 Bacterias Lácticas

Son microorganismos anaeróbicos facultativos y fermentadores de azúcares, gram positivas, catalasa negativas no esporuladas, no móviles. Con morfología en cocos y bacilos, presentan una división por bipartición. Sus colonias son generalmente pequeñas, blanco-grisáceas, lisas o rugosas. (6)

3.8.4.1 Lactobacillus

Presentan morfología de células alargadas en pares o en cadenas, tamaño 0.5-1.2 x 1.0-10µm.

En el proceso de fermentación se encuentra ***Lactobacillus fermentum***, ***Lactobacillus plantarum***, ***Lactobacillus casei***, ***Lactobacillus lactis***, ***Lactobacillus acidophilus***, ***Lactobacillus brevis***, entre otros. (6) (38)

3.8.5. Bacterias Aerobias

Las bacterias aerobias son organismos gram-positivos y gram-negativos, que cuentan con un metabolismo aeróbico. Son un tipo de bacterias que requieren oxígeno para su crecimiento y supervivencia. Las bacterias aeróbicas usan el oxígeno para la oxidación de los sustratos, tales como las grasas o los azúcares para obtener energía. (45)

Entre las bacterias aeróbicas presentes en el proceso de fermentación del cacao tenemos: ***Bacillus cereus***, ***Bacillus coagulans***, ***Bacillus licheniformis***, ***Bacillus megaterium***, ***Bacillus pumilus***, ***Bacillus pasteurii***, entre otros. (38)

3.9. Medios utilizados para el recuento de microorganismos

3.9.1 Bacterias acéticas

Para el recuento de este tipo de bacterias, los medios más utilizados son: Carbonato y RAE.

Medio carbonato

Este medio se encuentra constituido por los siguientes componentes: glucosa, extracto de levadura, carbonato de calcio y agar.

Este medio posee la cantidad de carbohidratos adecuados, para contribuir con la fuente de energía necesaria, para el crecimiento de las bacterias acéticas; además, cada colonia forma un halo transparente a su alrededor, siendo esto característico, de dichas bacterias en este medio y es por eso, que se considera una prueba de identificación. (1)

Medio RAE

El medio de cultivo, contiene los componentes necesarios para observar el crecimiento de bacterias acéticas. Junto con los elementos de Peptona, glucosa, fosfato sódico, ácido cítrico y agar, evitan el crecimiento de otros microorganismos, convirtiéndose en un medio selectivo muy particular. (1)

3.9.2. Hongos y levaduras

Medio agar papa dextrosa

Es un medio utilizado para aislar todo tipo de hongos y levaduras a partir de muestras de alimentos, derivados de leche y productos cosméticos.

El agar papa dextrosa puede ser suplementado con antibióticos o ácidos para inhibir el crecimiento bacteriano.

Este medio es recomendado para realizar el recuento de colonias. Algunos procedimientos señalan bajar el pH del medio a $3,5 \pm 0,1$ con ácido tartárico al 10% para inhibir el crecimiento bacteriano.

Componentes: infusión de papa, dextrosa y agar bacteriológico.

Las levaduras se observan como colonias de color crema o blanco. Los hongos crecen como colonias difusas y de varios colores.

La cuenta del número de colonias se relaciona con el factor de dilución de la muestra, para determinar el número de microorganismos por gramo o mililitro de muestra. (23)

3.9.3. Bacterias lácticas

Medio MRS

El agar MRS fue desarrollado por Man, Rogosa y Sharpe para proveer un medio que pudiera evidenciar un buen crecimiento de lactobacilos y otras bacterias ácido láctico. Este medio de cultivo permite un abundante desarrollo de todas las especies de lactobacilos. Tiene un color marrón claro.

El extracto de levadura, peptona y glucosa constituyen la fuente de nitrógeno, carbono y otros elementos necesarios para el crecimiento bacteriano, como las vitaminas. El polisorbato 80 es un tensioactivo que contribuye a la absorción de nutrientes por los lactobacilos, el sulfato de magnesio y sulfato de manganeso proporciona cationes utilizados en el metabolismo. El citrato de amonio es un componente utilizado en el medio para la inhibición del crecimiento de bacterias gram- negativas. (1) (24)

3.9.4. Bacterias aerobias

Medio plate count

Utilizado para el examen bacteriológico de comida, agua, leche y otros productos lácteos.

Composición: triptona, dextrosa, extracto de levadura y agar agar.

El digerido enzimático de caseína que proporciona los aminoácidos y otras sustancias nitrogenadas complejas necesarias para apoyar el crecimiento bacteriano. El extracto de levadura suministra principalmente las vitaminas del complejo B y la dextrosa proporciona la fuente de energía.

La temperatura de incubación es de 35-37° en condiciones aeróbicas durante 48 horas. (29)

3.10. Indicé de fermentación

Los polifenoles son compuestos que se encuentran en las semillas de cacao, se almacenan en las células pigmentadoras de los cotiledones como antocianinas y dependiendo de su cantidad estas células pueden llegar a tener una tonalidad púrpura oscura. En general los polifenoles presentes en las semillas de cacao desempeñan un papel importante en la calidad de la semilla ya que interviene en su apariencia, color, olor y sabor del cacao, un cacao con alta cantidad de polifenoles concede a la semilla astringencia y un sabor amargo muy acentuado. Con el proceso de fermentación estos compuestos disminuyen debido a reacciones de oxidación que se llevan a cabo en el proceso y la semilla de cacao fermentada se torna marrón oscuro. El índice de fermentación es un método que se utiliza para medir la presencia de polifenoles, un índice de fermentación de 1 o mayor de 1 indica que el cacao se encuentra debidamente fermentado y ha disminuido su contenido de polifenoles hasta en un 40% o menos con respecto a la cantidad inicial.

El índice de fermentación de la muestra se obtiene mediante el cálculo de la relación de absorbancia a 460 nm y la absorbancia a 530 nm. El análisis de antocianinas se realiza por espectrofotometría UV-Vis ya que debido a su estructura, las antocianinas presentan máximos de absorción tanto en la región visible como en la ultravioleta lo que resulta muy importante para la caracterización estructural de dichos compuestos. Sus espectros de absorción se caracterizan por tener dos bandas separadas una en la región visible entre 465 y 550 nm y otra más pequeña en el UV alrededor de 275 nm. Debido a esto el índice de fermentación se mide a estas dos longitudes de onda en la región visible. (22) (53)

CAPÍTULO IV
DISEÑO METODOLÓGICO

4.0 DISEÑO METODOLÓGICO

4.1. Tipo de estudio.

- Prospectivo: debido a que los resultados del estudio se observaron y se registraron a medida que ocurrieron; tomando en cuenta, que es el primer estudio que se ha llevado a cabo con mayor detalle en el país, con respecto a fermentación de semillas de cacao.
- Experimental: debido a que se realizó un estudio del proceso de fermentación en el laboratorio, se midió variables como temperatura y pH para determinar las etapas y microorganismos involucrados en el proceso de fermentación de las semillas de cacao.

4.2. Investigación bibliográfica.

- Se recopiló información bibliográfica en biblioteca Dr. Benjamín Orozco, de la Facultad de Química y Farmacia en la Universidad de El Salvador.
- Biblioteca de la Universidad Dr. José Matías Delgado
- Internet.

4.3. Investigación de campo.

Universo: Todos los frutos de cacao del cultivar San José del Real de La Carrera ubicada en el departamento de Usulután.

Muestra: dirigida a las tres accesiones de *Theobroma cacao* L. (cacao), de los tipos criollo, trinitario y forastero, que en estudios realizados anteriormente en el cultivar San José del Real de La Carrera, fueron caracterizados en fenotipos, lo que permitió realizar un estudio más selectivo para cada tipo de cacao.

4.3.1 Recolección de muestra ⁽⁴⁷⁾

- Recolección de los frutos, del cultivar San José del Real de La Carrera localizado en el departamento de Usulután. Los frutos estaban frescos, maduros y sanos para evitar que los resultados fueran afectados, ya que en el cacao inmaduro no se ha terminado de formar el mucílago, siendo este necesario para el inicio del proceso de fermentación del cacao, pues en él se encuentran los azúcares necesarios que se fermentaran. ⁽⁹⁾
- Se recolectó de los tres tipos de cacao: criollo, frutos de color verde o amarillo, rugosidad intensa y de forma ovoide; trinitario, frutos de color verde con morado o amarillo con rojo, rugosidad intermedia y forma oblonga; forastero, de color verde o amarillo, rugosidad ligera y forma esferoide. ⁽⁹⁾
- Se recolectaron entre dos y ocho frutos de cada tipo, para obtener la cantidad suficiente de semillas de cacao para realizar el proceso de fermentación. En el ensayo 3 y 4 solo se estudió dos tipos de cacao; criollo y trinitario.
- Los frutos que se recolectaron se clasificaron por tipo de cacao.

4.3.2 Almacenamiento y manejo de muestra.

Los frutos se depositaron, en bolsas plásticas rotuladas según el tipo de cacao. Luego se transportaron al laboratorio, evitando cualquier daño físico que pudiera afectar al fruto. Estos se sacaron de las bolsas para evitar acumulación de humedad, colocándolas sobre papel periódico y se almacenaron a temperatura ambiente en el laboratorio.

4.4 Proceso de fermentación. ^{(18) (36) (46) (49)}

- Los frutos se cortaron superficialmente de forma transversal sin dañar las semillas, utilizando un cuchillo.

- Se extrajeron las semillas de los frutos, para ello se utilizó guantes, se separaron las semillas maduras y eliminaron las semillas inmaduras, sobremaduras y enfermas.
- Las semillas de cacao maduras extraídas de cada uno de los frutos se pesaron, contaron y colocaron en depósitos plásticos, con capacidad de medio galón.
- Se agregó agua destilada en cantidad suficiente para cubrir las semillas de cacao.
- Las mezclas (solo en ensayo 4 se llamaron muestras, debido a la codificación asignada) se fermentaron por un período de 5 días.
- Se monitoreó la temperatura, pH e índice de fermentación y recolectó muestra de fermento cada día, partiendo del día 0 de fermentación hasta el día 5 para realizar el recuento de microorganismos.

Para este estudio, se realizaron 4 ensayos de fermentación, los ensayos 1 y 2 se realizaron a temperatura ambiente (23°C), durante los 5 días de fermentación, utilizando mezclas de tipos de cacao, como se detalla en cada ensayo.

En los ensayos 3 y 4, se trabajó controlando pH y temperatura, con el objeto de observar algún cambio importante en el proceso de fermentación.

En el ensayo 4, se contó con tres muestras de cacao la primera y segunda con criollo, y la tercera con trinitario y posteriormente cada muestra se dividió en dos partes (obteniéndose así 6 muestras) una parte se colocó en un recipiente de fermentación una a temperatura de 30° C a partir del día 0 hasta el día 2 y luego a partir del día 3 hasta el día 5 se colocaron a temperatura de 40°C. La otra parte, se colocó a temperatura de 40°C a partir del día 0 al día 2 de

fermentación, luego a 50°C a partir del día 3 al día 5; además desde el día cero se controló el pH cada 24 horas, manteniéndolo en 5.5 en todas las muestras.

Para realizar los ensayos se codificaron las mezclas como se describe en el cuadro N° 1

Cuadro N°1 Mezclas de semillas de cacao para ensayo 1 y su codificación.

MEZCLA	CODIGO
Mezcla 1	MX 1
Mezcla 2	MX 2
Mezcla 3	MX 3
Mezcla 4	MX 4
Mezcla 5	MX 5
Mezcla 6	MX 6

Cada código comprende el correlativo que se usó para identificar las mezclas en cada uno de los cuatro ensayos realizados en el laboratorio.

Además cada código de mezcla es un tipo de cacao o combinación de ellos, identificadas según su color, rugosidad de la superficie y forma del fruto.

4.5 Monitoreo de temperatura y pH

Medición de temperatura ⁽⁴⁰⁾

- Se tomó la temperatura utilizando un termómetro acoplado al pHmetro, midiendo la temperatura en la superficie, centro y fondo del recipiente fermentador, para cada día de fermentación, a partir del día cero.
- Las tres lecturas obtenidas se promediaron y anotaron en la tabla N° 17 (ver anexo N°4).

Medición de pH

-El pH se midió utilizando un pHmetro, previamente calibrado. Las lecturas de pH se tomaron en la superficie, centro y fondo del recipiente fermentador. De las tres lecturas se obtuvieron los promedios y anotaron en la tabla N° 17 (ver anexo N° 4).

4.6 Recolección de muestras de fermentación para recuento de microorganismos. ⁽⁴⁵⁾

- Se pipetearon 3 mL de cada mezcla en fermentación cada 24 horas, utilizando pipetas de morh estériles de 10,0mL.
- Los 3 mL de fermento se transfirieron a tubos de ensayo con rosca que contenían 5,0 mL de caldo cerebro corazón (CCC) con glicerol al 5 %, medido con pipeta volumétrica.
- Los tubos con muestra de fermento se almacenaron y congelaron durante 5 días para garantizar su preservación y detener el proceso de fermentación (ver anexo N° 5).

4.7 Recuento de microorganismos ⁽⁴⁵⁾

- Para realizar el recuento de microorganismos, se utilizaron las muestras de fermento recolectadas de los recipientes de fermentación cada 24 horas.
- Seguidamente, se prepararon diluciones decimales de 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} y 10^{-4} con agua peptonada como diluyente. (Ver anexo N° 6), con el objetivo de contar placas que contengan de 30 a 300 colonias.
- De las diluciones se tomaron 1 mL, se inocularon y sembraron por duplicado, utilizando el método de placa vertida.

- Se agregó entre 15 – 20 mL de agar fundido específico para cada microorganismo (bacterias aerobias, hongos, levaduras, bacterias lácticas y acéticas), enfriado a 45-50 °C. Mezclando por rotación, utilizando técnica en ocho y se dejó solidificar. (23) (24)
- Las placas se incubaron a temperatura y tiempo de incubación específica para cada microorganismo, como se señala en el cuadro N° 2. (23) (24)

Cuadro N° 2 Medios de cultivos, temperaturas y tiempos de incubación por microorganismo

MICROORGANISMOS	MEDIOS	TEMPERATURA DE INCUBACION	TIEMPO DE INCUBACION
Bacterias aerobias	Plate count	35-37 °C En aerobiosis	1 día
Mohos y levaduras	Agar Papa dextrosa	25°C En aerobiosis	3 a 5 días
Bacterias lácticas	MRS	35-37°C en anaerobiosis	3 días
Bacterias acéticas	CaCO ₃ y RAE	35-37°C En aerobiosis	5 a 7 días

- Posteriormente se realizó el conteo en placa en un cuenta colonias obteniéndolos datos en UFC/mL.
- De los datos obtenidos en UFC/mL se calculó sus logaritmos (log) para realizar las gráficas de crecimientos de microorganismos.

4.8 Identificación de microorganismos

La identificación se realizó para cada una de las bacterias en estudio (aerobias, hongos, levaduras, acéticas y lácticas) según se detalla a continuación:

4.8.1. Morfología macroscópica

Se observaron colonias en las placas de petri, después del tiempo de incubación, para cada uno de los medios utilizados. Luego se anotó morfología y se esperó tener colonias características, ver cuadro N° 3. (23) (24) (29) (30)

Cuadro N° 3 Microorganismos y morfologías de sus colonias

MICROORGANISMOS	MORFOLOGIA DE COLONIAS
Bacterias aerobias	Colonias circulares pequeñas amarillentas
Mohos y levaduras	Mohos. Colonias algodonosas, purverulentas Levaduras. colonias húmedas, cremosas o pastosas
Bacterias lácticas	Colonias pequeñas, blancas-grisáceas, lisas o rugosas
Bacterias acéticas	Colonias circulares blanco opalescente

4.8.2. Morfología microscópica (27)

4.8.2.1 Preparación de frotis bacteriano

- Se tomó un portaobjeto limpio, se flameó e identificó la preparación.
- Sobre el portaobjeto se colocó una gota de solución salina.
- El asa bacteriológica se esterilizó en la llama del mechero y dejó enfriar.
- Con el asa, se tomó una colonia de microorganismos suspendiéndola en la solución salina.
- La preparación se dejó secar al aire y cerca del mechero.
- La preparación fue fijada, pasándola ligeramente por la llama, evitando el calentamiento excesivo.

4.8.2.2 Tinción de Gram.

- Al frotis bacteriano se le añadió colorante cristal violeta yodo por un minuto y se lavó con agua destilada.
- Se aplicó el mordiente (lugol) por un minuto y se lavó con agua destilada.
- Agregó alcohol acetona y se dejó reposar por 15-20 segundos.
- Se añadió safranina o fuscina por un minuto y luego se lavó con agua destilada.
- Cuidadosamente, se secó utilizando papel toalla.
- Se observó en microscopio la morfología. (23) (24) (29)

Cuadro N° 4. Microorganismo y su morfología microscópica. (38) (39) (45)

MICROORGANISMOS	MORFOLOGIA MICROSCOPICA
Bacterias aerobias	Bacterias gram-positivas y gram-negativas.
Mohos y levaduras	Gram-positivas y gram-negativas esféricas, ovaladas.
Bacterias lácticas	Gram-positivas, cocos y bacilos.
Bacterias acéticas	Gram-negativas, elipsoidal o cilíndricas.

4.9 Índice de fermentación. (35)

- Se procedió a secar las semillas de cacao, de cada mezcla en fermentación, tomadas a partir del día 0 hasta el día 5, en una estufa, a temperatura de 50-60°C durante aproximadamente 48 horas, o hasta obtener un tostado adecuado de tal manera que permita realizar el descascarillado de las semillas.

- Se trituro las semillas de cada mezcla, utilizando un mortero y pistilo. Se pesaron 0,5 g de cada una y se colocaron en frascos volumétricos de 50,0 mL.
- Posteriormente los frascos volumétricos se llevaron a volumen con una mezcla reciente de metanol-HCl (97:3). Este procedimiento se realizó en cámara de extracción de gases, utilizando guantes de látex y mascarilla de gases.
- Se almacenaron a 8°C en refrigeración por 16-19 hrs. posteriormente se filtraron utilizando papel filtro.
- El filtrado se agregó en frasco volumétrico de 50,0 mL y aforó con la mezcla de metanol-HCl (97:3).
- Utilizando el espectrofotómetro a 460 nm y 530 nm de longitud de onda, se obtuvieron las absorbancias de las tres réplicas de cada mezcla. Se utilizó como blanco la mezcla metanol-HCl (97:3).
- El índice de fermentación se obtuvo de la relación de absorbancia de 460 nm entre la absorbancia de 530 nm (ver anexo N° 3).

4.9.1 Tiempo de fermentación de las semillas de cacao ⁽³⁵⁾

El tiempo de fermentación se determinará con los resultados de índice de fermentación. Un IF de 1 hasta 1,5 indica semillas de cacao bien fermentadas.

4.10 Desviación estándar. ⁽³³⁾

La desviación estándar se aplicará a los datos obtenidos de temperatura, pH e índice de fermentación con el objeto de medir que tanto se alejan los datos de la media aritmética, según la siguiente fórmula: $S = \sqrt{\sum n_i (X_i - \bar{X})^2 / N}$

CAPÍTULO V
RESULTADOS Y DISCUSIÓN
DE RESULTADOS

5.0 RESULTADOS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS

5.1 Clasificación de frutos recolectados.

Se recolectaron entre 2 a 8 frutos por mezcla. Estos se encontraban sanos y frescos; posteriormente se dejaron madurar en el laboratorio, a temperatura ambiente, cubiertos con papel filtro, entre 3 a 4 días, antes de iniciar el proceso de fermentación, para cada ensayo.

En el cultivar San José del Real de La Carrera se recolectaron frutos de las tres accesiones de cacao: criollo, trinitario y forastero; se clasificaron con base al color, forma y rugosidad de la superficie del fruto. (47)

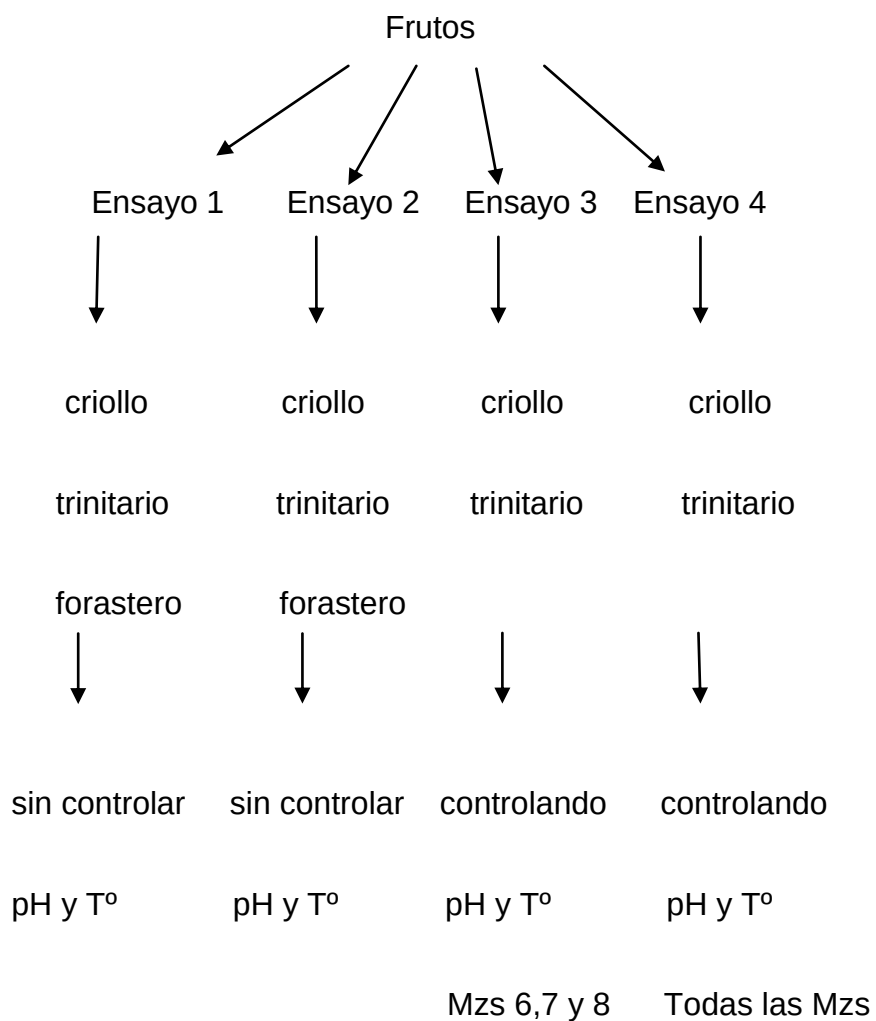
En el siguiente cuadro se describe la clasificación.

Cuadro N° 5 Clasificación del cacao según color, forma y rugosidad del fruto.

TIPO DE CACAO	DESCRIPCIÓN DE LA MUESTRAS	MUESTRAS DE FRUTOS DE CACAO
Criollo	- Color: verde o amarillo. - Forma: ovoide. - Rugosidad: intensa.	
Trinitario	- Color: verde con morado o amarillo con rojo - Forma: oblongada - Rugosidad: intermedia	
Forastero	- Color: verde o amarillo. - Forma: esferoide. - Rugosidad: ligera.	

A continuación se detallan los resultados de cada uno de los 4 ensayos realizados.

Esquema general de los ensayos realizados



Continuación de esquema general de ensayos

Ensayo 3



Mezclas controladas

6,7 y 8

T° 30°C → 0-2 días

T° 40°C → 3-5 días

pH 5.5 → 0-5 días

Ensayo 4



Mezclas controladas

1.1, 1.2 y 1.3 → T° 30°C → 0-2 días

T° 40°C → 3-5 días

1.2, 2.2 y 3.2 → T° 40°C → 0-2 días

T° 50°C → 3-5 días

pH 5.5 → 0-5

En el ensayo 3 se controlaron pH y temperatura solo en las mezclas 6,7 y 8 con el objeto de verificar diferencias en el proceso de fermentación con respecto a las demás mezclas del ensayo.

En el ensayo 4 se realizaron 3 mezclas, la primera y segunda con cacao criollo, y la tercera cacao trinitario. Cada una de estas mezclas se dividió en 2 partes, por ejemplo de la mezcla 1 se dividió en 2 partes y se le asignó a una parte 1.1 y a la segunda parte 1.2 y así para las otras 2 mezclas respectivamente (ver tabla 13, página 111).

5.2 Ensayo 1

5.2.1 Proceso de fermentación.

Para este ensayo se realizaron seis mezclas, conformadas entre 2 a 6 frutos de cacao, para la mezcla 6 solo se analizaron dos frutos, debido a que estos presentaron un color rojo y forma esferoide (amelonada) muy característico y que difiere de los demás frutos recolectados. Estos frutos son una posible combinación de cacao trinitario con forastero; por ello se trataron por separado con el objeto de observar alguna variante en el proceso de fermentación.

En el cuadro N° 6 se detalla el código que se asignó a cada tipo de cacao, cantidad de fruto recolectado y código asignado a cada fruto recolectado.

Cuadro N° 6 Muestras de tipos de frutos de cacao analizados en ensayo 1.

Código de tipo de cacao	Tipo de Cacao	Cantidad de frutos recolectados	Codificación de frutos
MX 1	Cacao criollo	6	A1, B1, C1, D1, E1 y F1
MX 2	Cacao trinitario	5	A2, B2, C2, D2 y E2
MX 3	Cacao criollo	4	A3, B3, C3 y D3
MX 4	Cacao criollo	4	A4, B4, C4 y D4
MX 5	Cacao criollo	3	A5, B5 y C5
MX 6	Cacao trinitario	3	A6, B6 y C6
MX 7	Cacao forastero	5	A7, B7, C7, D7 y E7

5.2.2 Peso y número de semillas por fruto.

En la tabla N° 1, se muestran el número y peso total de las semillas frescas y maduras con mucílago, contenidas por frutos.

Tabla N° 1 Peso promedio de semillas por frutos ensayo 1

FRUTOS	NUMERO DE FRUTOS	NUMERO TOTAL DE SEMILLAS	PESO TOTAL DE SEMILLAS (g)	PESO PROMEDIO DE SEMILLAS (g)
Cacao criollo	6	266	978,602	3,678
Cacao trinitario	5	189	510,822	2,703
Cacao criollo	4	167	610,820	3,658
Cacao criollo	4	182	571,096	3,138
Cacao criollo	3	140	418,852	2,992
Cacao trinitario	3	122	383,874	3,140
Cacao forastero	5	185	645,214	3,488

Debido a que el tamaño de los frutos, no era igual para todas las mezclas y la cantidad y tamaño de semillas de cada fruto era diferente, no todas las mezclas tienen igual peso total de semillas, como se puede observar en los cuadros. Además no se trabajó igual número de frutos para cada mezcla, este varió de acuerdo a la necesidad del ensayo.

En general, el peso promedio de cada semilla osciló entre 2,707 – 3,678 g.

Luego se procedió a formar las siguientes mezclas a partir de la tabla N° 1:

Cuadro N° 7 Mezclas formadas a partir de los frutos de la tabla N°1.

Mezcla	Código de frutos de cada muestra	Tipos de Cacao
Mezcla 1	E1 B2 B3 A4 C5 D7	Criollo, trinitario y forastero.
Mezcla 2	D1 C2 B5 C6 C7	Criollo, trinitario y forastero.
Mezcla 3	B1 F1 D3 C4 A7	Criollo y forastero.
Mezcla 4	A1 E2 D2 B4 A6	Criollo y trinitario.
Mezcla 5	C1 A2 C3 E7	Criollo, trinitario y forastero.
Mezcla 6	A3 D4 A5 B6 B7	Criollo, trinitario y forastero.

Las mezclas que se formaron como se detalla en el cuadro N° 7, se realizaron al azar y contienen semillas de diferentes tipos de cacao. Estas posteriormente se compararon con mezclas conformadas por un solo tipo de cacao (se comparó con los ensayos 3 y 4) con el objeto de verificar si es adecuado el tratamiento que se realiza en el cultivar San José del Real de La Carrera, pues no lo separan por tipos de cacao al momento de fermentar.

Para indicar o conocer cual es el tipo de cacao predominante en cada una de las mezclas se calculó los porcentajes en peso de cada accesión utilizada en la mezcla, es importante porque sirve para medir diferencias en el proceso de fermentación, con los ensayos 2,3 y 4 en los que se fermentó sin calcular porcentajes (ver anexo N° 11).

5.2.3 Monitoreo de temperatura.

Para la fermentación de las mezclas en este ensayo no se modificó la temperatura, dejándose fermentar a temperatura de laboratorio aproximadamente a 23°C.

La temperatura en cada una de las seis mezclas estudiadas en este ensayo se monitoreó midiéndose en la parte inferior, central y superior del recipiente cada 24 horas, durante los cinco días de fermentación. Estos datos se muestran en la tabla N° 2.

En la tabla N°2 y en la figura N°3 se presentan los promedios de temperatura obtenidas de las mezclas en el ensayo 1.

Tabla N° 2 Promedios de temperatura y desviación estándar de las mezclas en fermentación ensayo 1

Temperaturas °C.						
	Día 0	Día 1	Día 2	Día 3	Día 4	Día 5
Mezcla 1	27,97±0,17	28,30±0,16	28,33±0,05	28,13±0,09	27,67±0,12	27,87±0,05
Mezcla 2	28,07±0,05	28,50±0,00	28,33±0,24	27,73±0,45	27,83±0,09	28,07±0,05
Mezcla 3	28,13±0,05	28,33±0,17	28,27±0,19	28,00±0,36	27,63±0,17	27,87±0,05
Mezcla 4	28,20±0,08	28,40±0,31	28,50±0,14	28,20±0,26	27,60±0,09	28,00±0,10
Mezcla 5	28,13±0,09	28,23±0,31	28,40±0,14	27,90±0,50	27,70±0,14	27,87±0,12
Mezcla 6	27,87±0,09	28,37±0,12	28,33±0,09	28,00±0,14	27,60±0,14	27,97±0,12

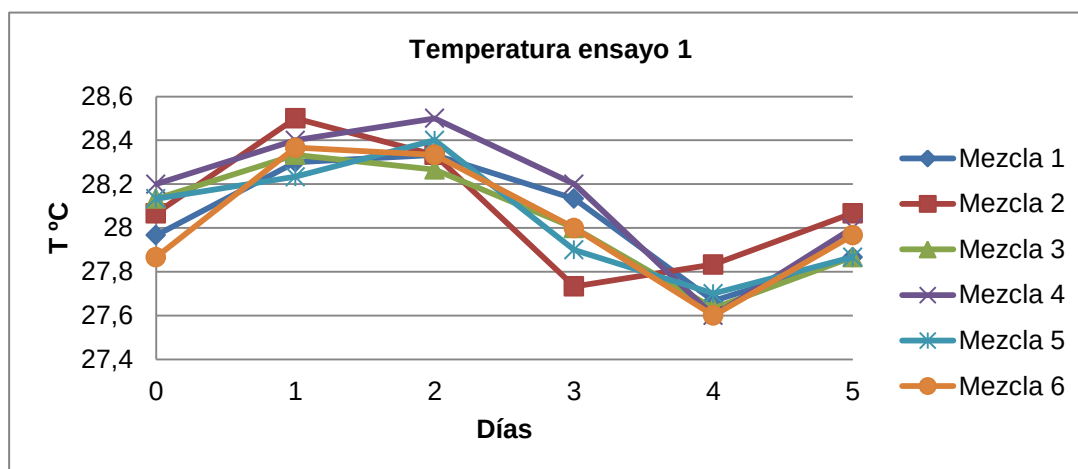


Figura N° 3. Resultados obtenidos de temperatura de las mezclas fermentadas en ensayo 1.

La temperatura superior se reportó el día 1 siendo de 28,5°C. Como se observa en el día 1 y 2, se alcanzó el nivel más alto de temperatura durante la fermentación, siendo 28,5°C la temperatura superior alcanzada por las mezclas de cacao, este incremento se debe al aumento de bacterias aerobias, que favorecen el proceso exotérmico en la fermentación, elevando así la temperatura y transformando el etanol en ácido acético reacción favorecida por el oxígeno en el medio. (10)

La temperatura inferior se reportó en el día 4, sin embargo se puede observar que durante todo el proceso la temperatura se mantuvo bastante estable.

No se alcanzaron temperaturas arriba de los 30°C, como se esperaba, según estudios anteriores encontrados en la bibliografía consultada. Probablemente esto se debió a que el sustrato se encontraba agotado y no permitió aumento en el crecimiento de bacterias aerobias, por tanto no se observó incremento de la temperatura. (10)

Además, es importante recordar que las condiciones de fermentación variaron en el ensayo con respecto a estudios consultados; por ejemplo una diferencia notable es que para los 4 ensayos se utilizaron proporciones de agua en los

recipientes de fermentación, y en los estudios consultados fermentan sin agregar agua.

5.2.4 Medición de pH.

Se determinó el pH en cada una de las seis mezclas estudiadas en este ensayo; midiéndose en la parte inferior, central y superior del recipiente cada 24 horas, durante los seis días de fermentación. En la tabla N° 3 se muestran los datos de pH obtenidos de cada una de las mezclas.

Tabla N° 3 Promedio de pH obtenidos en las mezclas en fermentación ensayo 1

pH						
	Día 0	Día 1	Día 2	Día 3	Día 4	Día 5
Mezcla 1	4,10±0,016	4,05±0,005	3,72±0,017	3,62±0,005	3,76±0,022	3,88±0,009
Mezcla 2	4,30±0,027	4,19±0,005	3,85±0,009	3,67±0,012	3,68±0,000	3,64±0,008
Mezcla 3	4,30±0,008	4,30±0,022	3,98±0,009	3,66±0,000	3,68±0,005	3,68±0,008
Mezcla 4	3,97±0,048	4,08±0,012	3,66±0,012	3,58±0,005	3,57±0,009	3,58±0,000
Mezcla 5	4,17±0,036	4,08±0,012	3,66±0,012	3,58±0,005	3,54±0,005	3,65±0,022
Mezcla 6	4,05±0,017	4,16±0,014	3,94±0,012	3,67±0,008	3,65±0,005	3,62±0,005

Se obtuvo un promedio de las tres mediciones de pH realizadas y se graficó según se muestra a continuación.

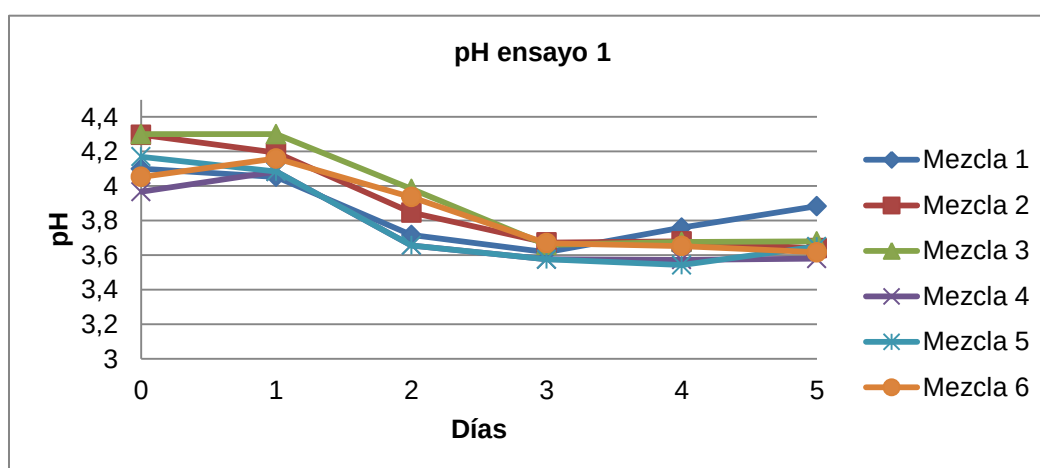


Figura N° 4. Resultados de pH en la mezclas de fermentación ensayo 1

En el día 0 y 1 se reportó el pH más alto, durante este ensayo. Además desde el día 2 el pH comenzó a disminuir, probablemente a la formación de componentes ácidos en el proceso de fermentación (ácido acético y ácido láctico), provocando la muerte del embrión en la semilla, evitando así su germinación. (10)

A partir del día 3 el pH osciló entre 3,58 – 3,88. La medición inferior de pH se reportó en el día 4.

No se observa variación marcada, considerando el porcentaje y tipo de cacao utilizado, todas las mezclas presentaron la misma tendencia.

5.2.5 Índice de fermentación (IF)

Para el índice de fermentación, se utilizaron semillas tomadas de los recipientes en fermentación, a partir del día 0 al día 5 de fermentación, Se tomaron al azar entre 6 a 8 semillas, obteniéndose los datos que se muestran en la tabla N° 4. Se realizaron lecturas, de las tres replicas, de cada mezcla para índice de fermentación, utilizando un espectrofotómetro (UV/VIS) a una longitud de onda 460 nm y 530 nm. (18)

En el cuadro N° 8 se representa algunos ejemplos, de mezclas listas para medir el índice de fermentación en el día 0 y 1 del ensayo 1.

Cuadro N° 8 Mezclas para toma de índice de fermentación.

Días de Fermentación	Antes de Refrigerar	Después de Refrigerar
Mezclas Día 0		
Mezclas Día 1		

Las mezclas después de refrigerar presentan una coloración más intensa, esto se debió a que el solvente utilizado, extrajo los compuestos fenólicos presentes en las semillas de cacao. Estos se encuentran en forma de flavonoides entre ellos las antocianinas, las cuales se hidrolizan durante el proceso de fermentación disminuyendo así su contenido en la semilla de cacao, y es esta disminución de antocianinas la que se medirán en el índice de fermentación, por ello a mayor intensidad de color mayor cantidad de antocianinas y viceversa. Se midió, el índice de fermentación, realizando las lecturas de absorbancia en el espectrofotómetro UV/VIS a 460 nm y 530 nm porque a esta longitud de onda se identifican las antocianinas en el espectro presentando una banda a 460nm y otra a 530nm. (Ver anexo N° 12). (10) (38)

Los datos que aparecen en la Tabla N° 4, son el resultado de dividir la absorbancia obtenida en la mezcla a 460 nm, entre la absorbancia obtenida a 530 nm, dicho resultado se conoce como índice de fermentación. Al final se

reportó el promedio de las tres replicas, de cada mezcla para índice de fermentación con su respectiva desviación estándar de la media aritmética.

Tabla N° 4 Resultados obtenidos en las mezclas de índice de fermentación ensayo 1

Índice de fermentación						
	Día 0	Día 1	Día 2	Día 3	Día 4	Día 5
Mezcla 1	1,148 ± 0,022	0,722 ± 0,055	0,824 ±0,019	0,716 ±0,006	0,574 ±0,017	1,565 ±0,038
Mezcla 2	0,549 ± 0,003	0,510 ± 0,002	1,202 ±0,135	0,690 ±0,007	0,562 ±0,006	1,355 ±0,033
Mezcla 3	0,799 ± 0,022	0,721 ± 0,031	0,666 ±0,007	0,765 ±0,021	0,644 ±0,002	1,159 ±0,010
Mezcla 4	0,718 ± 0,049	0,653 ±0,018	0,856 ±0,006	0,523 ±0,008	0,531 ±0,003	0,865 ±0,006
Mezcla 5	0,485 ± 0,005	0,676 ±0,023	0,909 ±0,003	0,675 ±0,010	0,658 ±0,009	1,507 ±0,076
Mezcla 6	0,415 ± 0,004	0,765 ±0,041	0,713 ±0,005	0,517 ±0,005	0,507 ±0,004	1,412 ±0,032

En la tabla N° 4 se representan los datos promedios obtenidos de índice de fermentación y son representados en la figura N° 5.

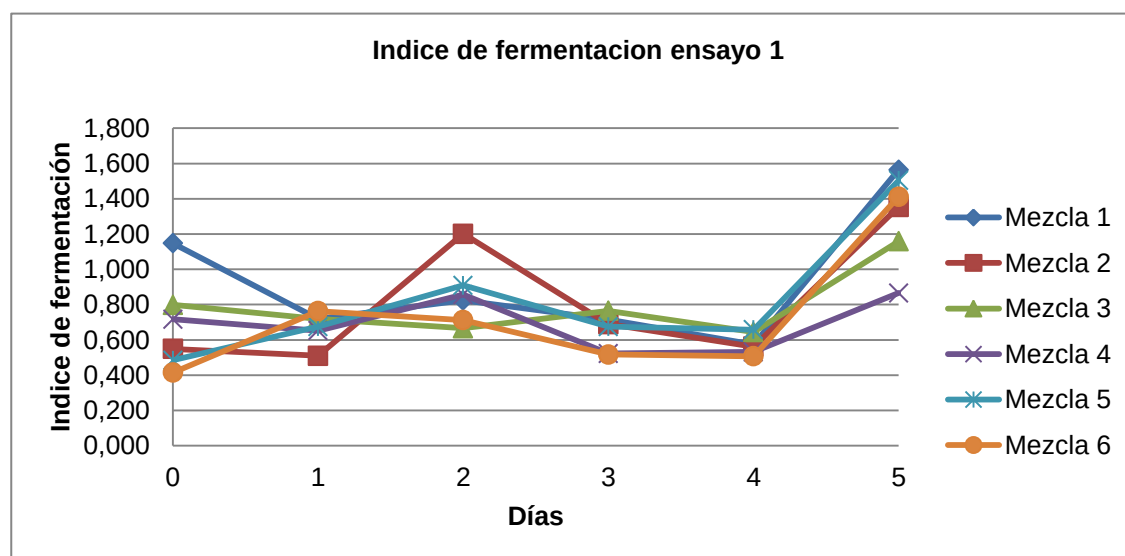


Figura N° 5. Resultados obtenidos de índice de fermentación en las mezclas del ensayo 1.

En el día cero se obtuvo un valor de índice de fermentación arriba de 1 para la mezcla 1 y en el día 2 para la mezcla 2; no obstante, en los días siguientes se observó que estos valores bajaron posiblemente debido a que las semillas tomadas para realizar la determinación estaban maduras en comparación a las restantes, por lo tanto, se puede concluir que aún faltaba más tiempo de fermentación en la muestra.

En la tabla N°4 se observa un índice de fermentación con valores entre 0,415 a 0,909 en los primeros 4 días, siendo hasta el día 5 que la tendencia sube bruscamente alcanzando cifras entre 0,865 a 1,565, cabe enfatizar que únicamente la mezcla 4 se encuentra con el valor más bajo 0,865, es importante denotar que esta mezcla no lleva cacao forastero y probablemente esto influyó en el resultado; las demás mezclas alcanzaron valores arriba de 1. Según los resultados obtenidos las mezclas se deben fermentar de 4 a 5 días para garantizar que el proceso de fermentación se lleve a cabo adecuadamente y obtener un índice de fermentación con valores de 1 o mayor.

Según los resultados obtenidos se puede concluir que en el día 5 de la fermentación, se logró la disminución de los compuestos fenólicos reduciendo así el amargor y astringencia del cacao. (8) (38)

5.2.6 Recuento de microorganismos

El recuento se realizó en cuatro medios de cultivo: Man, Rogosa y Sharpe (MRS), medio reforzado con ácido acético y etanol (RAE), papa dextrosa (PD) y conteo en placa (PC), para las bacterias Lácticas, Acéticas, Hongos y Levaduras y Aerobias, respectivamente. A los datos de recuentos obtenidos en UFC/mL se les calculó sus logaritmos (log) para realizar las gráficas que se presentan a continuación.

- Gráficas recuento de microorganismos de las mezclas 1 a la 6 del ensayo
1

En la mezclas 1y 2 se puede observar que en los días 0 y 1 los recuentos para todos los microorganismos son bajos, del día 1 hasta el día 3 se puede observar un incremento de hongos, levaduras, bacterias lácticas y aerobias debido a que el medio proporciona la temperatura, los nutrientes necesarios y suficientes para su desarrollo. En el día 4 y 5 se puede observar un incremento de bacterias lácticas, acéticas y aerobias.

En la mezcla 3 el día 4 y 5 se puede observar un incremento de bacterias acéticas, probablemente debido a la formación de una mayor cantidad de ácido acético, obteniéndose un pH de 3,68 en estos días de fermentación. Se observó una disminución de bacterias aerobias y lácticas debido a una mayor presencia de ácido acético.

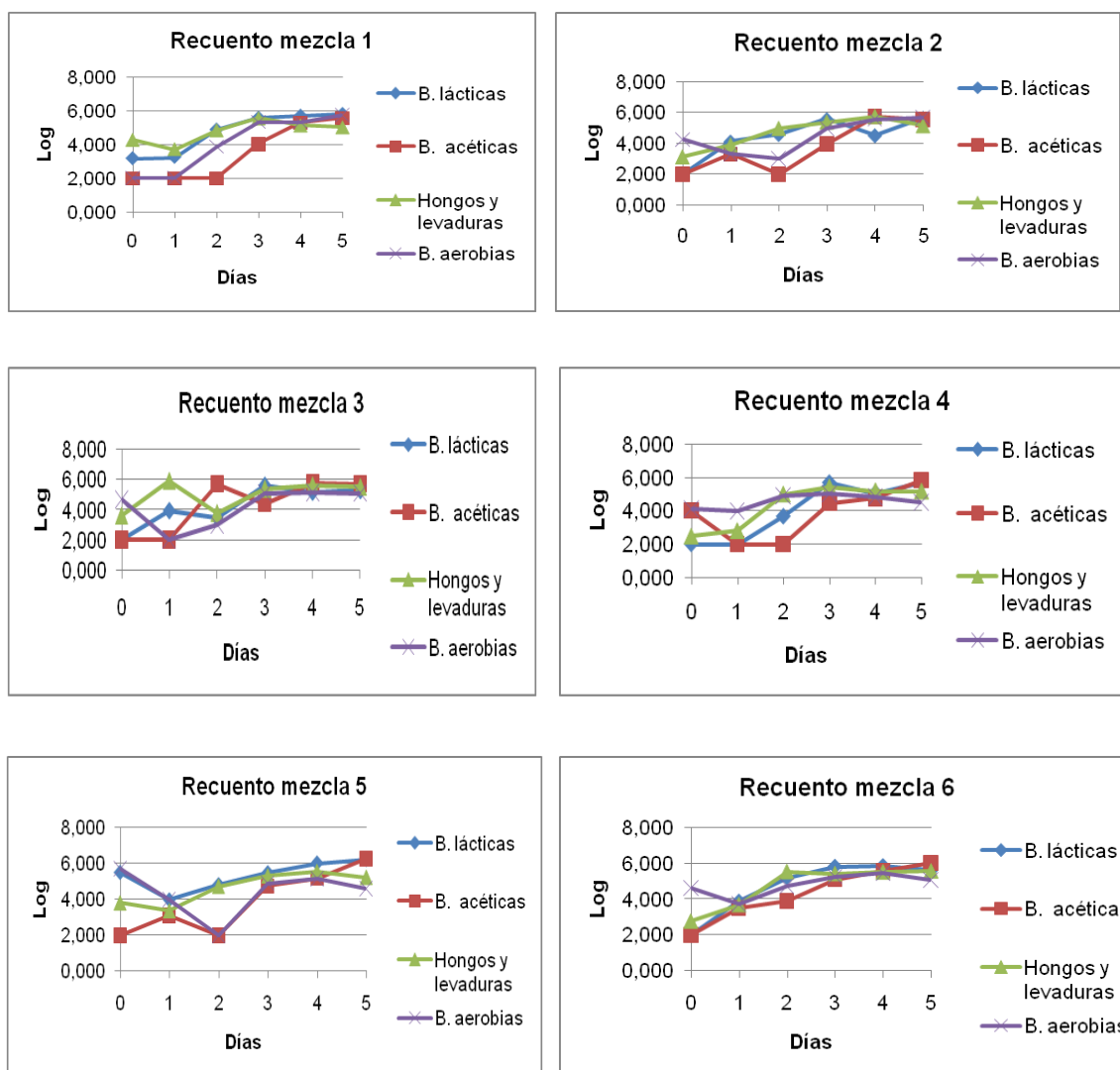


Figura N° 6. Recuento de microorganismos de la mezclas 1 a la 6 de bacterias lácticas, acéticas, aerobias, hongos y levaduras ensayo 1.

En la mezcla 5 se puede observar que en los días 0 y 1, los recuentos para los microorganismos son bajos, a excepción de las bacterias aeróbicas que en el día 0 presentaron recuento alto, esto se debió probablemente, a las condiciones de manipulación de las semillas de cacao al inicio de la fermentación, además las semillas podrían haber contenido bacterias aeróbicas procedentes del ambiente, no obstante en el día 1 este disminuyó debido a la acción de los

demás microorganismos presentes, el día 3 se puede observar un incremento de hongos, levaduras. En el día 4 y 5 se puede observar un incremento notable de bacterias lácticas y acéticas, generando una disminución de pH de 3,54 a 3,65.

En general en el ensayo 1 las bacterias aerobias, presentan su mayor crecimiento a partir de los últimos 3 días de fermentación debido a que se generó una fase aerobia.

Los hongos y levaduras, tienen su mayor crecimiento entre los días 3 y 4, esto probablemente, debido a que en estos días, no se obtuvo un incremento de temperatura mayor a 28,5; luego presentaron una disminución en el recuento el día 5 debido al aumento de las bacterias ácido lácticas y acéticas, que presentaron su crecimiento máximo los dos últimos días de fermentación. Esto nos indica que se formaron componentes ácidos, como resultado de la oxidación de los alcoholes, obtenidos a partir de la reducción de los azúcares presentes en las semillas de cacao. Estos ácidos son fundamentales en el proceso de fermentación, ya que promueven la muerte del embrión en la semilla de cacao evitando además la germinación de esta, proceso necesario que permite una buena fermentación. (4) (5) (45)

5.3 Ensayo 2

5.3.1 Proceso de fermentación

Para este análisis se recolectaron siete muestras de frutos las cuales se codificaron según se indica en el cuadro N° 9.

Cuadro N° 9 Muestras por tipos de cacao analizadas en ensayo 2

Código de tipo de cacao	Tipo de cacao	Cantidad de frutos recolectados	Codificación de frutos
MX 1	Cacao criollo	6	B1, C1, D1, E1, F1, G1
MX 2	Cacao criollo	6	A2, B2, C2, E2, F2, G2
MX 3	Cacao criollo	6	A3, B3, C3, D3, E3, F3
MX 4	Cacao forastero	9	A4, B4, C4, D4, E4, F4, G4, H4, I4
MX 5	Cacao trinitario	9	A5, B5, C5, D5, E5, F5, G5, H5, I5
MX 6	Cacao criollo	5	A6, B6, C6, D6, E6
MX 7	Cacao forastero	3	A7, B7, C7

5.3.2 Tamaño de los frutos

En el cuadro N° 10, se presentan las medidas de ancho y alto de algunos de los frutos utilizados en este ensayo.

En los frutos de cacao criollo se puede observar que el ancho se encuentra entre 9 y 10cm y la altura entre 16 y 24 cm. En los frutos de cacao forastero el ancho es de aproximadamente 9.5 cm y la altura entre 17,5 y 18 cm. Los frutos de cacao trinitario presentaron un ancho de 10cm aproximadamente y la altura entre 18,5 y 19 cm.

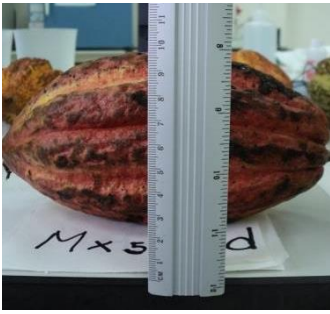
El ancho de los frutos muestreados se encuentran entre 9 a 10 cm, sin marcada entre los tipos de cacao.

En cuanto a la altura se encuentra entre los 16 a 24 cm. Probablemente el tamaño de los frutos, varía según el tipo de árbol al cual pertenecen, o a las condiciones ambientales propias en que se encuentra cada uno, etc. (9) (24)

Cuadro N° 10 Tamaño de frutos por tipo de cacao ensayo 2

Muestra	Altura (cm)	Ancho (cm)
mezcla 2, Fruto E cacao criollo	 16 -17cm	 9cm
mezcla 3, Fruto C cacao criollo	 20-21cm	 10cm
mezcla 4, Fruto I cacao forastero	 17.5-18cm	 9-9.5cm

Cuadro N° 10 Continuación

Muestra	Altura (cm)	Ancho (cm)
mezcla 5, Fruto D cacao trinitario	 18,5-19cm	 10 cm
mezcla 6, Fruto D cacao criollo	 24cm	 10cm

5.3.3 Peso y número de semillas por fruto

En la tabla N° 5, se muestran los números y pesos de semillas maduras y frescas con mucilago, contenidas por fruto en cada mezcla.

Debido a que el tamaño de los frutos, no era igual para todas las mezclas y la cantidad y tamaño de semillas de cada fruto era diferente, no todas las mezclas tienen igual peso total de semillas, como se puede observar en los cuadros. Además no se trabajó igual número de frutos para cada mezcla.

Tabla N° 5 Número y peso de semillas en frutos ensayo 2

FRUTOS	NUMERO DE FRUTOS	NUMERO TOTAL DE SEMILLAS	PESO TOTAL DE SEMILLAS (g)	PESO PROMEDIO DE SEMILLAS (g)
Cacao criollo	6	229	772,962	3,375
Cacao criollo	6	200	632,672	3,163
Cacao criollo	6	299	862,514	2,885
Cacao forastero	9	373	1,353.476	3,629
Cacao trinitario	9	369	1,074.199	2,911
Cacao criollo	5	209	749,896	3.588
Cacao forastero	3	87	175,618	2,019

En general el peso de las semillas oscila aproximadamente entre 2,091 y 3,642g.

Con Los frutos representados anteriormente, se procedió a formar las mezclas que aparecen el cuadro N° 11.

Para estas mezclas no se tomó en cuenta los frutos A1 y D2, debido a que no reunía las condiciones para fermentar.

Cuadro N° 11 Mezclas de tipos de cacao formadas a partir de los frutos recolectados

Mezcla	Código de frutos de cada mezcla	Tipo de Cacao
Mezcla 1	A4, B4, H4, F4, C5, I5, F5, B6, A6	Cacao criollo, trinitario y forastero
Mezcla 2	G1, D1, B1, F2, G2, B2, F3, E3, A3	Cacao criollo
Mezcla 3	E1, C1, D3, C3, A5, B5, G5, D5	Cacao criollo y trinitario
Mezcla 4	E2, A2, D4, E4, C4, D6, E6	Cacao forastero y criollo
Mezcla 5	F1, C2, B3, G4, I4, E5, H5, C6	Cacao trinitario, criollo y forastero
Mezcla 6	A7, B7, C7	Cacao forastero
Mezcla 7	combinación de las 6 mezclas obtenidas	Cacao criollo, trinitario y forastero

En este análisis se estudió cacao criollo y forastero por separado en las mezclas 2 y 6 respectivamente, esto con el objetivo de estudiar alguna variante en estos tipos de cacao. También se encuentran las mezclas 3 y 4 que presentan únicamente dos tipos de cacao.

La mezcla 7 es una combinación de las mezclas 1 hasta la 6, esta se realizó con el objeto de verificar si existe una variación, al trabajar el cacao, sin clasificarlo por tipos.

También se pretende obtener un dato importante, ya que en el cultivar San José del Real de La Carrera, el proceso de fermentación se realiza sin clasificar el fruto.

Para este análisis se omitió calcular el porcentaje, por tipo de cacao, debido a que la mezcla 7, fue una combinación de todas las mezclas, esto no permitió,

obtener un dato exacto, de los porcentajes analizados, para las 6 primeras mezclas.

La mezcla 7 sirvió, para conocer alguna variante en el proceso e involucra todos los tipos de cacao, con la diversidad de tamaños y formas de los frutos.

5.3.4 Monitoreo de temperatura

Se monitoreo la temperatura en cada una de las siete mezclas estudiadas en este ensayo; midiéndose en la parte inferior, central y superior del recipiente cada 24 horas, durante los 5 días de fermentación.

En la tabla N° 6 se muestran los promedios de las temperaturas tomadas con su respectiva desviación estándar.

Tabla N°6. Promedios obtenidos de temperatura en las mezclas en fermentación ensayo 2

Temperatura ° C						
	Día 0	Día 1	Día 2	Día 3	Día 4	Día 5
Mezcla 1	28,37±0,15	29,00±0,00	29,00±0,22	27,53±0,05	26,33±0,09	26,10±0,00
Mezcla 2	28,67±0,21	28,90±0,00	29,20±0,00	27,53±0,05	26,03±0,17	25,77±0,05
Mezcla 3	28,70±0,08	28,80±0,00	28,93±0,17	27,20±0,14	26,20±0,22	26,00±0,08
Mezcla 4	28,53±0,05	28,93±0,05	28,87±0,26	27,77±0,12	26,27±0,12	26,07±0,05
Mezcla 5	28,67±0,12	28,90±0,00	29,00±0,08	27,70±0,08	26,17±0,05	25,97±0,05
Mezcla 6	29,10±0,08	29,17±0,05	29,10±0,00	27,33±0,09	26,33±0,31	26,30±0,08
Mezcla 7	28,77±0,05	29,27±0,05	27,90±1,70	27,67±0,05	26,33±0,09	26,07±0,05

Al final se obtuvo un promedio de las tres mediciones realizadas, siendo este el que aparece en la gráfica de temperatura que se muestra a continuación.

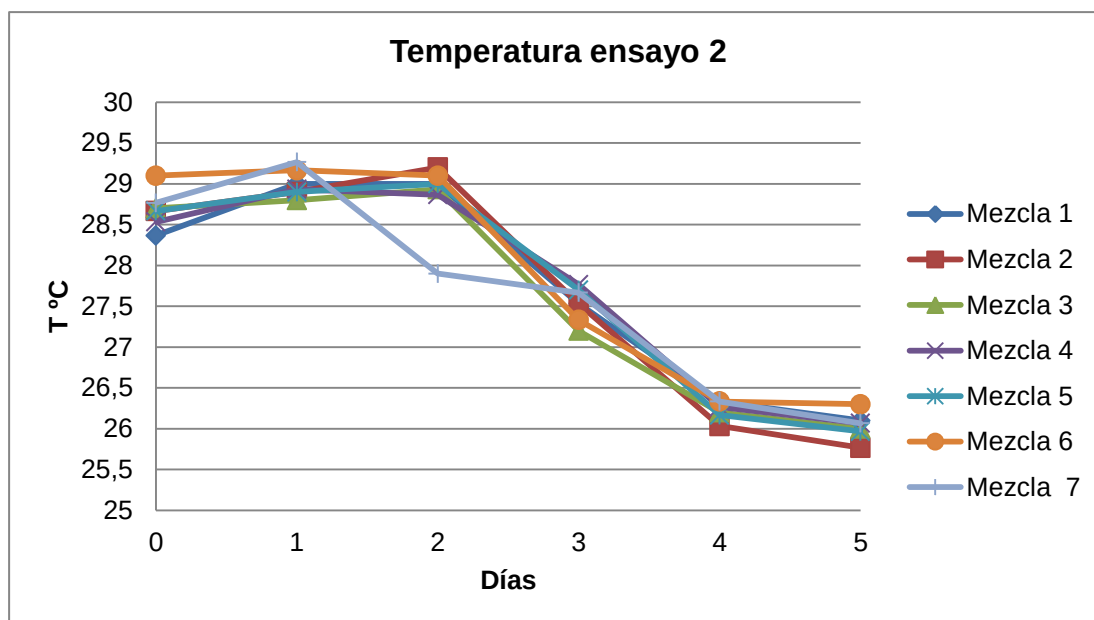


Figura N° 7. Resultados obtenidos de temperatura en ensayo 2 tomadas de las mezclas en fermentación.

La temperatura superior se reportó el día 1 y la inferior se reportó en el día 5.

Cabe recalcar que a partir del día 3 se observó una disminución en la temperatura y ésta continuó disminuyendo hasta el día 5, en este día se obtuvo entre 2 y 4°C menos que al inicio del proceso de fermentación. Probablemente este cambio se debió a que las bacterias ya habían consumido el sustrato en los primeros días, dando así lugar a la disminución de la misma.

El proceso exotérmico se desarrollo en los primeros 2 días y a partir del día 3 se disminuyó la temperatura probablemente a la formación de componentes ácidos en el medio. (4) (5) (45)

5.3.5 Medición de pH

Se midió el pH en cada una de las siete mezclas estudiadas en este ensayo; midiéndose en la parte inferior, central y superior del recipiente cada 24 horas, durante los seis días de fermentación.

Tabla N° 7. Promedios de pH de las mezclas en fermentación ensayo 2

pH						
	Día 0	Día 1	Día 2	Día 3	Día 4	Día 5
Mezcla 1	3,82±0,012	3,84±0,005	3,74±0,000	3,51±0,008	3,62±0,005	3,62±0,012
Mezcla 2	3,81±0,009	3,83±0,040	3,67±0,012	3,58±0,009	3,61±0,009	3,64±0,008
Mezcla 3	3,86±0,016	3,89±0,026	3,66±0,031	3,55±0,012	3,58±0,005	3,58±0,008
Mezcla 4	3,90±0,004	3,97±0,025	3,60±0,005	3,52±0,000	3,56±0,005	3,55±0,008
Mezcla 5	3,84±0,005	3,85±0,037	3,65±0,021	3,56±0,008	3,61±0,005	3,60±0,014
Mezcla 6	4,39±0,008	4,23±0,033	3,61±0,012	3,42±0,005	3,41±0,005	3,44±0,005
Mezcla 7	3,80±0,005	3,89±0,008	3,66±0,005	3,48±0,017	3,59±0,008	3,60±0,017

Al final se obtuvo un promedio de las tres mediciones realizadas, siendo este el que aparece en la gráfica de pH que se muestra a continuación.

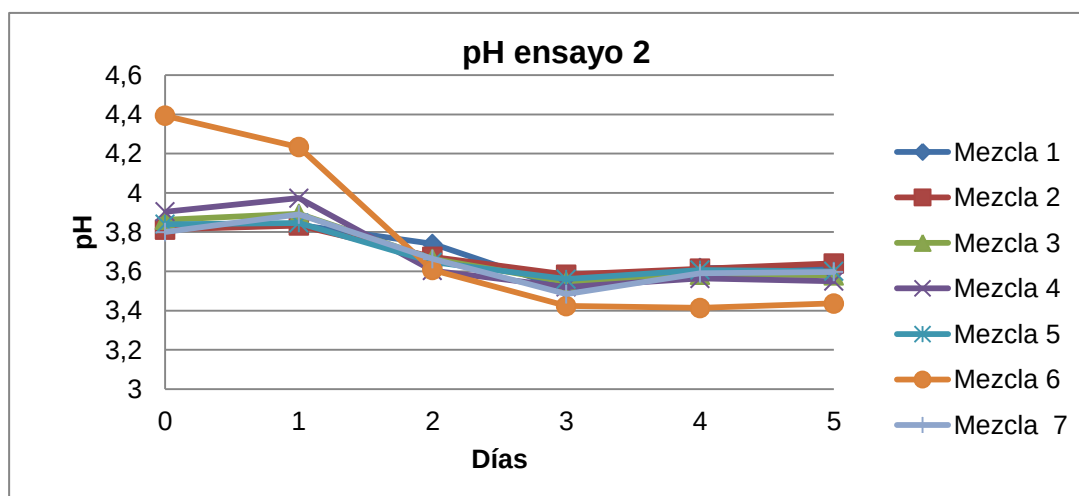


Figura N° 8. Resultados obtenidos de pH de las mezclas en fermentación ensayo 2.

Se puede observar, que a partir del día 3 hasta el día 5, del proceso de fermentación, el pH se mantuvo bastante constante, variando solo por aproximadamente 0,2. La medición inferior de pH se reportó en el día 4 y la superior se reportó el día 0.

La mezcla 6 que corresponde a cacao forastero, presentó al inicio de la fermentación el pH más alto y concluyó el día 5 con el pH más ácido en comparación a las demás mezclas.

Conforme avanzó el proceso de fermentación, el pH fue disminuyendo de tal manera, que se concluyó, con un pH más ácido que al inicio del ensayo, esto se debe al crecimiento de bacterias acéticas y lácticas, que permitieron la formación de componentes ácidos, aportando mayor acidez al medio. Este grado de acidez, es necesario para promover la muerte del embrión en la semilla de cacao, evitando su germinación, preservando con ello su calidad, además estos componentes ácidos penetran en la semilla de cacao, desencadenando la formación de sustancias aromáticas agradables, necesarias para aportar las condiciones adecuadas a la semilla, para su posterior utilización en la industria chocolatera. (4) (5) (8)

5.3.6 Índice de fermentación (IF) (22) (35)

Para el índice de fermentación se utilizaron semillas de cacao de las mezclas de fermentación, tomadas de los recipientes de fermentación a partir del día 0 al día 5 de fermentación, se tomaron al azar, entre 6 a 8 semillas; obteniéndose los datos a una longitud de onda a 460nm y 530nm. (Ver anexo N° 13)

Para esto se realizaron lecturas de las tres replicas de cada mezcla para índice de fermentación, utilizando un espectrofotómetro. Finalmente se obtuvo un promedio con su respectiva desviación estándar indicándonos que los datos se encuentran muy cercanos a la media aritmética. (22) (53)

Tabla N° 8. Datos de índice de fermentación en las mezclas ensayo 2

Índice de fermentación						
	Día 0	Día 1	Día 2	Día 3	Día 4	Día 5
Mezcla 1	0,722 ±0,019	0,642 ±0,002	0,738 ±0,004	0,869 ±0,022	0,827 ±0,015	1,117 ±0,024
Mezcla 2	0,653 ±0,009	1,262 ±0,002	0,630 ±0,007	0,529 ±0,008	0,621 ±0,002	1,669 ±0,082
Mezcla 3	0,630 ±0,007	0,799 ±0,004	0,930 ±0,020	0,707 ±0,013	0,769 ±0,012	1,232 ±0,029
Mezcla 4	0,665 ±0,003	0,866 ±0,017	0,662 ±0,001	0,895 ±0,042	0,900 ±0,010	1,344 ±0,063
Mezcla 5	0,565 ±0,004	0,931 ±0,000	1,086 ±0,033	0,698 ±0,016	0,984 ±0,003	1,451 ±0,036
Mezcla 6	0,513 ±0,001	0,573 ±0,009	0,908 ±0,024	0,566 ±0,014	0,752 ±0,002	1,177 ±0,020
Mezcla 7	0,593 ±0,010	0,564 ±0,005	0,734 ±0,024	0,623 ±0,005	0,630 ±0,005	1,108 ±0,014

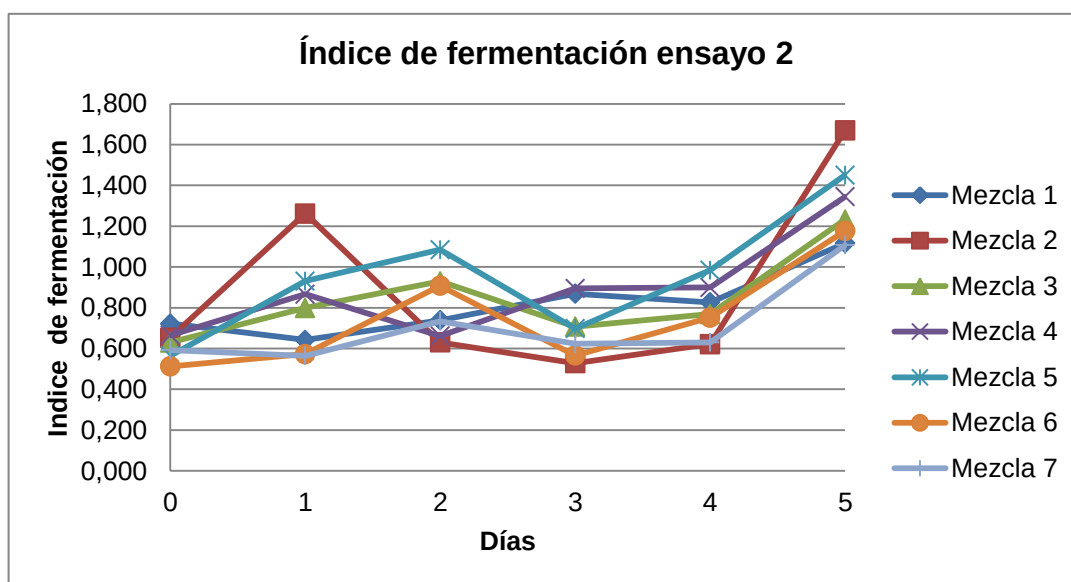


Figura N° 9. Resultados obtenidos de índice de fermentación en las mezclas ensayo 2.

En la figura N° 9, se observa que se alcanza la fermentación completa de las semillas de cacao, hasta el día 5, teniéndose incluso valores arriba de 1. Índices de 1 a 1,5 son los requeridos, para garantizar que el proceso de fermentación, es el adecuado y por tanto, entre 4 y 5 son los días necesarios,

que se deben dejar fermentar las mezclas en recipientes plásticos, tapados y colocados a temperatura de laboratorio debido a que los compuestos fenólicos han disminuido con la fermentación. (8) (38)

5.3.7 Recuento de microorganismos

El recuento se realizó en cuatro medios de cultivo MRS, RAE, PD y PC para las bacterias Lácticas, Acéticas, Hongos y Levaduras y Aerobias, respectivamente. Luego se procedió a obtener los datos en logaritmos (log) para realizar las gráficas. Además para bacterias acéticas se incluyó también medio carbonato.

- Gráficas recuento de microorganismos mezclas 1 a la 7 ensayo 2

En los recuentos del ensayo 2, las bacterias lácticas presentan su máximo crecimiento el día 3 para mezclas 1, 2, 3 y 4; para mezclas 5, 6 y 7 su máximo crecimiento fue hasta el día 5, Las bacterias acéticas presentan su mayor crecimiento el día 5.

Los hongos y levaduras presentan su máximo crecimiento entre el día 4 y 5, siendo la temperatura quien jugó un papel importante, debido a que en estos días oscilo entre los 25 y 26°C en el fermento, otorgando condiciones adecuadas para su crecimiento.

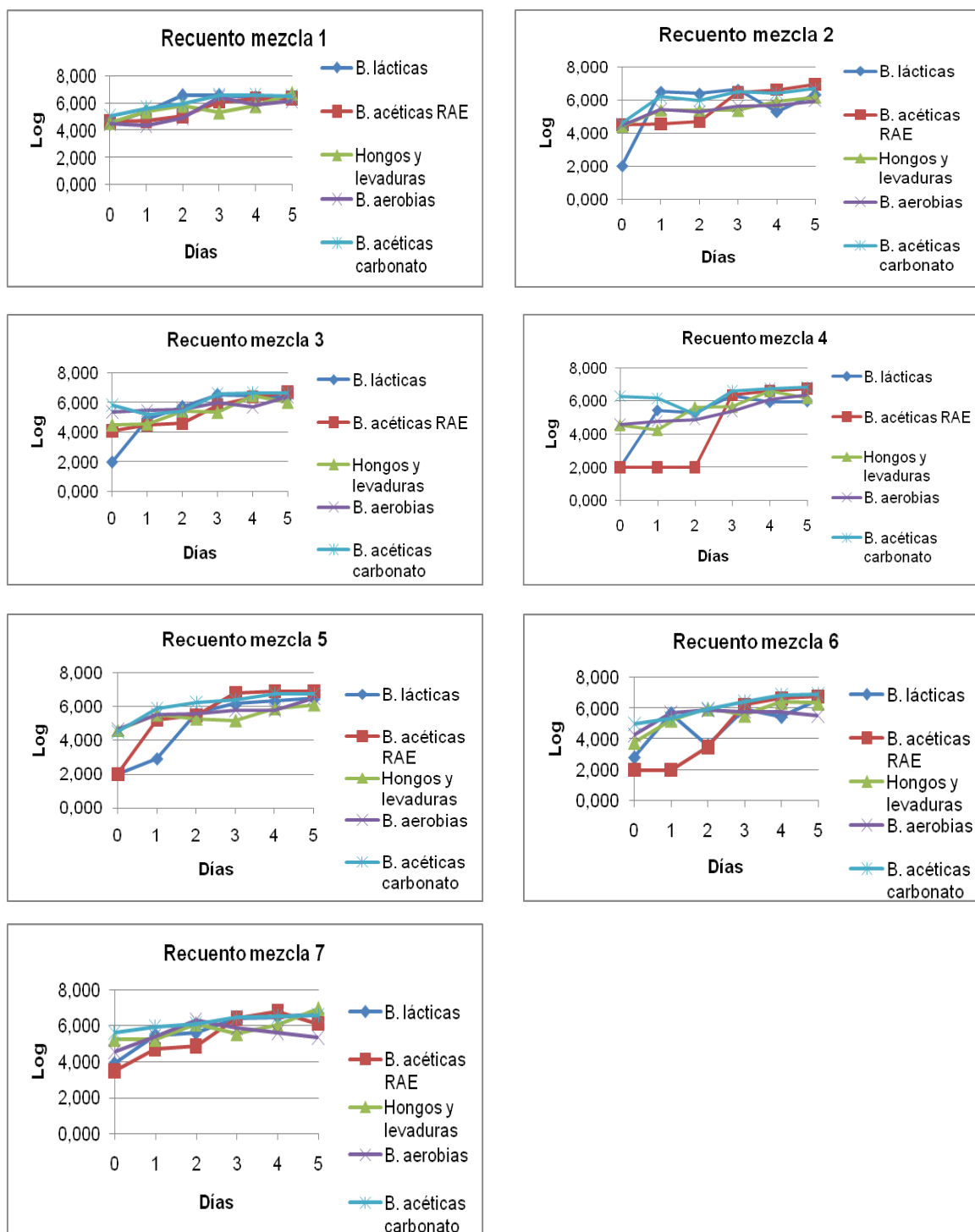


Figura N° 10. Recuento de microorganismos en las mezclas para bacterias lácticas, acéticas, aerobias, hongos y levaduras ensayo 2

Las bacterias aeróbicas presentan su máximo crecimiento el día 5, Se denota que en el día 5 de fermentación, el recuento de bacterias acéticas y lácticas, es mayor con respecto a los otros tipos de microorganismos estudiados, esto permitió mayor formación de ácidos (láctico y acético) y por tanto muerte del embrión, en la semilla de cacao, evitando así su germinación.

En el día 5 se observa mayor cantidad de bacterias acéticas, solo en la mezcla 4 que contenían los tipos forastero y criollo se observó mayor crecimiento de hongos y levaduras y en la mezcla 7 que es una combinación de las mezclas 1 a la 6, también se observó este comportamiento probablemente debido a la manipulación de las mezclas durante los 5 días de fermentación, obteniendo estos microorganismos del ambiente y con ello aumentando su crecimiento.

Los recuentos de microorganismos, indican que una mezcla más fermentada presenta mayor recuento, de bacterias lácticas y acéticas y las menos fermentadas, presentan mayor recuento de levaduras.

Según los resultados obtenidos, las mezclas con mayor presencia de levaduras, a partir del día 3 presentaron, un grado de fermentación menor.

5.4 Ensayo 3

5.4.1 Proceso de fermentación

Este ensayo se dividió en ocho mezclas. El siguiente cuadro detalla el código que se asignó a cada mezcla según el tipo de cacao estudiado.

Cuadro N° 12 Mezclas de tipos de cacao estudiadas ensayo 3

Código de Mezcla	Tipo de Cacao	Cantidad de frutos recolectados	Codificación de frutos
MX 1	Cacao criollo	4	A1, B1, C1, D1
MX 2	Cacao criollo	2	A2, B2
MX 3	Cacao criollo	4	A3, B3, C3, D3
MX 4	Cacao criollo	2	A4, B4
MX 5	Cacao trinitario	4	A5, B5, C5, D5
MX 6	Cacao criollo	4	A6, B6, C6, D6
MX 7	Cacao criollo	4	A7, B7, C7, D7
MX 8	Cacao criollo	4	A8, B8, C8, D8

En este ensayo no se realizaron combinaciones de tipos de cacao; se trabajaron mezclas que contenían un solo tipo de cacao, según el cuadro N° 12.

En este ensayo se analizó cacao criollo mayoritariamente, debido a que éste se encuentra en mayor cantidad, en el cultivar San José del Real de La Carrera, además de cacao trinitario, esto con el objetivo de estudiar alguna variante, en el proceso de fermentación en estos tipos de cacao.

5.4.2 Pesos y números de semillas por frutos

Cada mezcla contenía cierta cantidad de frutos, por ello a cada uno, se le asignó un código para diferenciarlo de los demás, con el objeto de calcular el peso y número de semillas por frutos.

En la tabla N° 9, se muestran los números y pesos totales de semillas por frutos.

Tabla N° 9. Número y peso promedio de semillas en mezclas del ensayo 3

MEZCLAS	NUMERO DE FRUTOS	NUMERO TOTAL DE SEMILLAS	PESO TOTAL DE SEMILLAS (g)	PESO PROMEDIO DE SEMILLAS (g)
Mezcla 1 Criollo	4	140	570,60	4,076
Mezcla 2 Criollo	2	56	192,60	3,439
Mezcla 3 Criollo	4	146	407,00	2,788
Mezcla 4 Criollo	2	84	282,90	3,368
Mezcla 5 Trinitario	4	109	418,10	3,836
Mezcla 6 Criollo	4	175	525,90	3,005
Mezcla 7 Criollo	4	165	720,60	4,367
Mezcla 8 Criollo	4	151	478,40	3,168

Al igual que en los ensayos 1 y 2, se observó que el tamaño de los frutos, no era igual para todas las mezclas, por lo tanto la cantidad y tamaño de semillas de cada fruto fue diferente, debido a esto las mezclas, no tienen igual peso total de semillas, como se puede observar en los cuadros. Además no se trabajó igual número de frutos para cada mezcla.

5.4.3 Monitoreo de temperatura

Se monitoreó la temperatura en cada una de las ocho mezclas estudiadas en este ensayo; midiéndose en la parte inferior, central y superior del recipiente cada 24 horas, durante los 5 días de fermentación.

Es importante enfatizar que las mezclas 6,7 y 8 los días 0 y 1, se mantuvieron a temperatura controlada en baño maría, con el objeto de simular las condiciones de temperatura con que se cuenta en el cultivar San José del Real de La Carrera, a 30°C y a partir de los días 3 al 5 de fermentación, se mantuvo controlada a 40°C.

En la siguiente tabla se muestran los promedios de las temperaturas tomadas con su respectiva desviación estándar que nos indica que los datos se encuentran cercanos a la media aritmética.

Tabla N° 10. Promedios obtenidos de temperatura de las mezclas en fermentación ensayo 3

Temperatura ° C					
	Día 0	Día 1	Día 3	Día 4	Día 5
Mezcla 1	21,23±0,21	23,60±0,05	24,60±0,09	24,27±0,09	24,43±0,09
Mezcla 2	21,20±0,08	23,43±0,05	24,60±0,12	24,06±0,17	24,30±0,00
Mezcla 3	20,70±0,22	23,50±0,08	24,20±0,02	24,53±0,21	24,40±0,12
Mezcla 4	21,20±0,08	23,60±0,05	24,40±0,00	24,40±0,08	24,47±0,09
Mezcla 5	21,10±0,00	23,00±0,29	24,50±0,08	24,30±0,08	24,17±0,25
Mezcla 6	21,50±0,09	31,90±0,05	31,87±0,71	36,63±0,12	44,03±0,05
Mezcla 7	21,70±0,05	30,20±0,05	32,50±0,38	36,80±0,08	44,13±0,05
Mezcla 8	21,73±0,05	32,50±0,08	32,03±0,45	35,50±0,16	44,27±0,17

Al final se obtuvo un promedio de las tres mediciones realizadas, siendo este el que aparece en la gráfica de temperatura que se muestra a continuación.

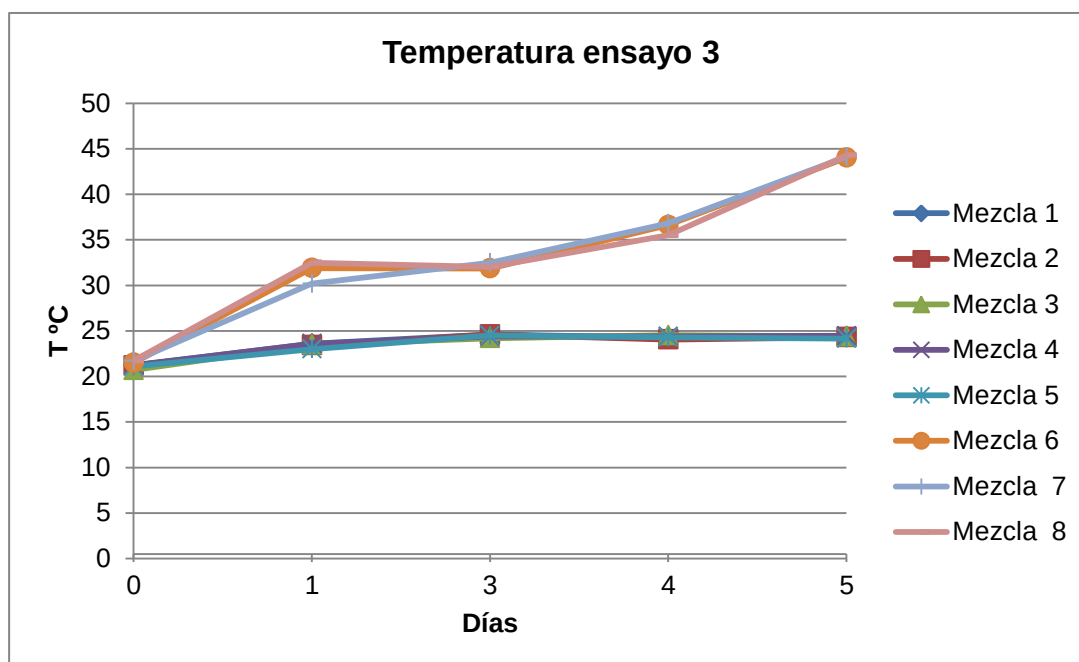


Figura N°11. Resultados obtenidos de temperatura en mezclas ensayo 3.

En la gráfica se puede observar que las mezclas 1 a la 5 siguen una tendencia diferente a las mezclas 6,7 y 8 debido a las diferentes temperaturas a las que fueron tratadas.

El día 0 la temperatura se encontró en el rango de 20,7 – 21,73.

El día 1, de la mezcla 1 hasta la mezcla 5, denotaron un incremento en la temperatura observándose un rango entre 23 y 23,6 °C casi un aumento de 2°C dando lugar al crecimiento de bacterias aerobias y con ello se generó un proceso exotérmico.

Las mezclas 6, 7 y 8, debido a que se mantuvieron a temperatura controlada en baño maría a 30°C, presentaron una temperatura de 30,2 a 32,5 en el día 1.

A partir del día 3 al 5, las mezclas 1- 5, se mantuvieron constantes entre aproximadamente los 24°C.

Las mezclas 6,7 y 8, los primeros días, se mantuvieron entre 31,87 y 32,5°C y a partir del día 4 se observa un incremento hasta los 36,8°C; luego el día 5 sube drásticamente la temperatura hasta los 44°C, este cambio se debió, al aumento de temperatura a 40°C, en el baño maría a partir del día 3. En este ensayo la temperatura máxima fue de 44°C en comparación al ensayo 1 se determinó una temperatura máxima de 28,07°C y en el ensayo 2 fue de 26,30°C. por lo tanto en condiciones no controladas el proceso de fermentación se desarrolla a temperaturas menores a 30°C.

5.4.4 Medición de pH

Se midió el pH en cada una de las 8 mezclas estudiadas en este ensayo; midiéndose en la parte inferior, central y superior del recipiente cada 24 horas, durante los 5 días de fermentación.

A las mezclas 6, 7 y 8 se les controló el pH, todos los días se les ajustó a 5,5 con solución de NaOH 3N, esto se realizó para observar algún cambio durante el proceso, ya que la literatura sugiere que una buena fermentación, es la que concluye con un pH de aproximadamente 5,5.

En la siguiente tabla se muestran los promedios de pH con su respectiva desviación estándar que nos permite observar que los datos son confiables debido a que estos no se alejan mucho de la media aritmética.

Tabla N° 11. Promedios de pH de las mezclas en fermentación ensayo 3

	pH				
	Día 0	Día 1	Día 3	Día 4	Día 5
Mezcla 1	3,64±0,037	3,30±0,008	3,59±0,000	3,53±0,000	3,26±0,022
Mezcla 2	3,70±0,017	3,40±0,017	3,38±0,008	3,28±0,000	3,11±0,005
Mezcla 3	3,19±0,019	3,41±0,005	3,29±0,017	3,14±0,000	3,03±0,005
Mezcla 4	3,54±0,019	3,16±0,022	3,45±0,008	3,42±0,008	3,31±0,005
Mezcla 5	3,36±0,022	3,53±0,000	3,12±0,009	3,10±0,005	3,06±0,012
Mezcla 6	5,51±0,027	4,56±0,005	4,12±0,021	4,71±0,025	5,08±0,008
Mezcla 7	5,49±0,005	4,72±0,005	3,91±0,012	5,22±0,008	5,36±0,012
Mezcla 8	5,50±0,021	4,85±0,000	4,23±0,005	4,73±0,012	5,55±0,033

Al final se obtuvo un promedio de las tres mediciones realizadas, siendo este el que aparece en la gráfica de pH que se muestra a continuación.

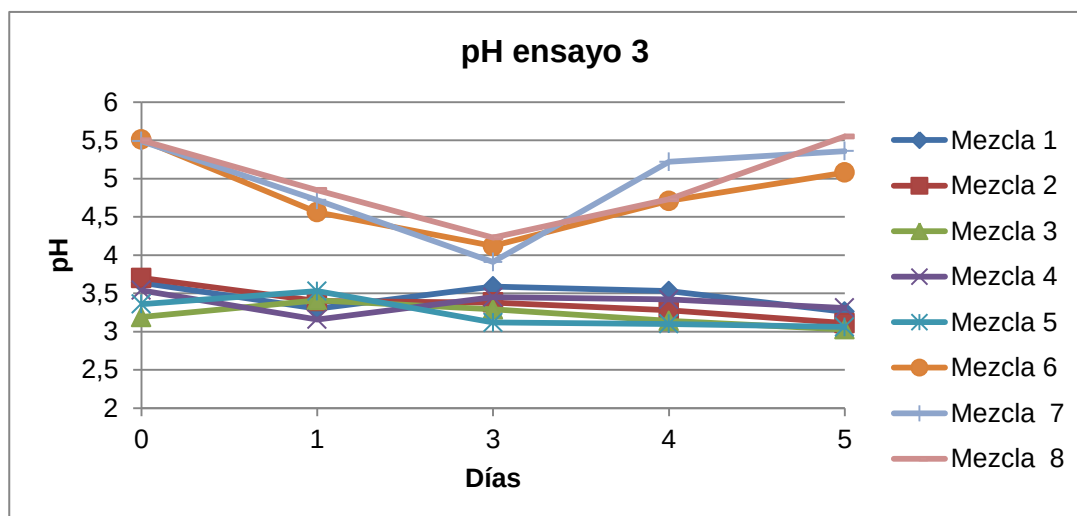


Figura N° 12. Resultados de pH obtenidos de las mezclas en fermentación ensayo 3.

En el gráfico se puede observar que las mezclas 1 hasta la 5 sin controlar pH y temperatura, muestran una tendencia bastante constante durante los 5 días de fermentación, con un pH de entre 3,03 y 3,64.

Mientras las mezclas 6, 7 y 8 muestran un pH superior encontrándose entre 3,91 y 4,85 en los días 1 al 2, luego el día 3 presenta una disminución, y el día 4 vuelve a aumentar el pH manteniendo esta tendencia, hasta el día 5, con pH entre 5,08 y 5,55.

5.4.5 Índice de fermentación

Para el índice de fermentación se utilizaron mezclas de fermentación, tomadas a partir del día 0 al día 5 de fermentación.

En la tabla N° 12 se muestra los datos de índice de fermentación obtenidos con su respectiva desviación estándar que nos indica que los datos se encuentran cercanos a la media aritmética.

Tabla N° 12. Datos de índice de fermentación obtenidos ensayo 3

Índice de Fermentación					
	Día 0	Día 1	Día 3	Día 4	Día 5
Mezcla 1	0,724 ±0,006	0,635 ±0,006	0,868 ±0,027	0,847 ±0,020	1,128 ±0,016
Mezcla 2	0,637 ±0,019	1,253 ±0,014	0,534 ±0,006	0,621 ±0,004	1,477 ±0,043
Mezcla 3	0,630 ±0,008	0,810 ±0,006	0,712 ±0,113	0,780 ±0,024	1,232 ±0,031
Mezcla 4	0,670 ±0,001	0,635 ±0,006	0,899 ±0,059	0,894 ±0,005	1,349 ±0,075
Mezcla 5	0,569 ±0,006	0,940 ±0,006	0,695 ±0,009	0,978 ±0,011	1,423 ±0,044
Mezcla 6	0,511 ±0,013	0,573 ±0,007	0,571 ±0,007	0,745 ±0,007	1,159 ±0,014
Mezcla 7	0,600 ±0,005	0,563 ±0,009	0,583 ±0,058	0,627 ±0,003	1,123 ±0,016
Mezcla 8	0,461 ±0,005	0,497 ±0,005	0,817 ±0,022	0,663 ±0,011	1,462 ±0,027

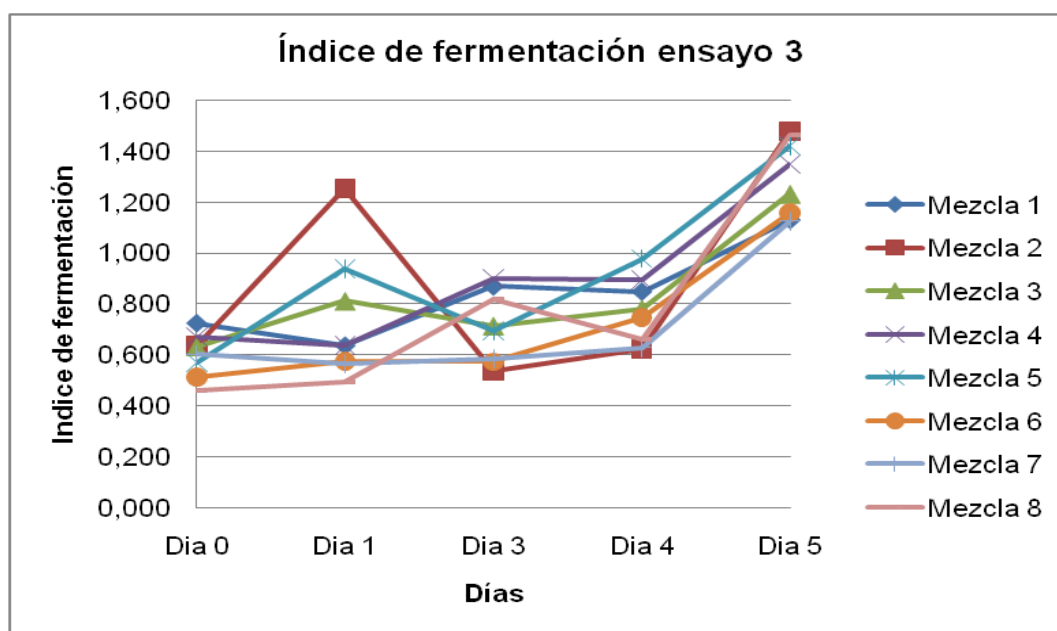


Figura N° 13. Resultados obtenidos de índice de fermentación en las mezclas ensayo 3

En la figura N°13, se observa que se alcanza la fermentación completa de las semillas de cacao, hasta el día 5, obteniéndose valores arriba de 1. Índices de 1

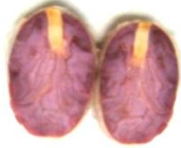
o mayores de 1 son los requeridos, para garantizar que el proceso de fermentación, es el adecuado y por tanto, 5 son los días necesarios, que se deben dejar fermentar las mezclas. No se observó, diferencia entre mezclas con temperatura y pH controlado, para alcanzar una buena fermentación en 5 días, pero si se observa, cambios físicos en las semillas, con respecto a las mezclas bajo control de T y pH; estas se observan más oscuras y con aspecto caramelizado (café oscuro), además con olor agradable a cacao bien fermentado y algunas olor característico a guineo.

A continuación se presentan fotografías de las semillas, correspondientes a cada día de fermentación:

En el cuadro N° 13 representa semillas de cacao de la mezcla 1 ensayo 3, al inicio de la fermentación las semillas presentaban una coloración violeta intensa, no obstante en el día 5 de fermentación se observó que las semillas tomaron un color violeta pálido, mostrando con ello la disminución de componentes fenólicos, la disminución de estos componentes es necesaria para otorgarle mejor sabor a la semilla de cacao, reduciendo su astringencia y amargor.

En los siguientes cuadros se observaron cambios de coloraciones en las semillas, al inicio presentaron coloración café a violeta intenso, al final de la fermentación esta coloración se observa menos intensa, mostrando así la disminución de componentes fenólicos en las semillas de cacao. (10)

Cuadro N° 13. Fotos de semillas fermentadas mezcla 1 ensayo 3

Semillas frescas ,inicio de proceso de fermentación ,día 0	
Semilla fermentadas luego de transcurrir 24 horas de fermentación, día 1	
Semillas con 48 horas de fermentación, día 2	
Día 3, 72 horas de fermentación	
Día 4, 96 horas de iniciada el proceso de fermentación	
Día 5, finalización del proceso de fermentación	

Cuadro Nº 14. Fermentación de semillas fermentadas mezcla 2 ensayo 3.

Día 1, 24 horas de fermentación	
Día 2, 48 horas de fermentación	
Día 3, 72 horas de fermentación	
Día 4, 96 horas de fermentación	
Día 5, 120 horas de fermentación	

Cuadro N°15. Fotos de semillas fermentadas mezcla 3 ensayo 3

Día 1, 24 horas de fermentación	
Día 2, 48 horas de fermentación	
Día 3, 72 horas de fermentación	
Día 4, 96 horas de fermentación	
Día 5, 120 horas de fermentación	

Cuadro N°16. Fotos de semillas fermentadas mezcla 4 ensayo 3

Día 1, 24 horas de fermentación	
Día 2, 48 horas de fermentación	
Día 3, 72 horas de fermentación	
Día 4, 96 horas de fermentación	
Día 5, 120 horas de fermentación	

En el cuadro N° 16 se observa coloración violeta intensa en el día 1 de fermentación, en el días posteriores se observa disminución en la intensidad del color.

Cuadro N°17. Fotos de semillas fermentadas mezcla 5 ensayo 3

Día 1, 24 horas de fermentación	
Día 2, 48 horas de fermentación	
Día 3, 72 horas de fermentación	
Día 4, 96 horas de fermentación	
Día 5, 120 horas de fermentación	

En el cuadro N° 17 se observa que al inicio de la fermentación, el color de la semilla es violeta intenso, en los siguientes días, esta coloración disminuye, para el día 5, la semilla de cacao presenta coloración violeta pálido, denotando con ello que el proceso de fermentación se ha llevado a cabo, disminuyendo amargor y astringencia en la semilla

Cuadro N°18. Fotos de semillas fermentadas mezcla 6 ensayo 3

Día 1, 24 horas de fermentación	
Día 2, 48 horas de fermentación	
Día 3, 72 horas de fermentación	
Día 4, 96 horas de fermentación	
Día 5, 120 horas de fermentación	

Cuadro N°19. Fotos de semillas fermentadas mezcla 7 ensayo 3

Día 1, 24 horas de fermentación		
Día 2, 48 horas de fermentación		
Día 3, 72 horas de fermentación		
Día 4, 96 horas de fermentación		
Día 5, 120 horas de fermentación		

Cuadro N°20. Fotos de semillas fermentadas mezcla 8 ensayo 3

Día 1, 24 horas de fermentación	
Día 2, 48 horas de fermentación	
Día 3, 72 horas de fermentación	
Día 4, 96 horas de fermentación	
Día 5, 120 horas de fermentación	

En los cuadros N° 21 y 22, se presentan fotografías de recipientes con cacao en fermentación.

Cuadro N° 21. Fermentación de mezcla 7 ensayo 3

Mezcla fermentada día 1		
Mezcla fermentada día 3		
Mezcla fermentada día 4		
Mezcla fermentada día 5, se observa cambio de color y consistencia.		

En las fotografías, se puede observar los cambios de coloración, que las semillas presentaron, durante el proceso de fermentación.

Al inicio del proceso tenían un color violeta oscuro, al finalizar la fermentación, las semillas de cacao se tornaron violeta suave (violeta pálido), con esto se denota que disminuyó la presencia de compuestos fenólicos en las semillas ya que una coloración violeta intensa, denota mayor cantidad de compuestos fenólicos. La disminución de estos compuestos, permite reducir el sabor amargo en el chocolate, otorgándole menos astringencia. (10)

Debido a que las semillas, se tomaron al azar, para observar su coloración, existe la probabilidad, de haber tomado una poca fermentada, en lugar de una bien fermentada.

En el cuadro N° 21 se observa que en el día 1 de fermentación, hay desprendimiento de CO₂, esto nos permite verificar que los microorganismos involucrados en este proceso, están influyendo en esta mezcla y por lo tanto en los días posteriores este proceso se ve aumentado observándose mayor presencia de CO₂, la coloración en el día 5 es marrón oscuro, su olor es característico a cacao bien fermentado. (1) (6) (38)

En el cuadro N° 22, se puede observar que ya en el día 1 de iniciado el proceso de fermentación, se observó desprendimiento de CO₂, esto también se observó en los días 3 y 4, el día 4 y 5 se denotó cambió en la coloración presentando coloración marrón intensa, también el aroma fue muy característico como a guineo y otras muestras, olor agradable a cacao fermentado. (38)

Cuadro N°22 Fermentación de mezcla 8 ensayo 3

Mezcla fermentada día 1	
Mezcla fermentada día 3	
Mezcla fermentada día 4	
Mezcla fermentada día 5, se observa cambio de color y consistencia	

5.4.6 Recuento de microorganismos

A continuación se presentaran las gráficas de recuento de microorganismos de las mezclas 1 a la 8 del ensayo 3

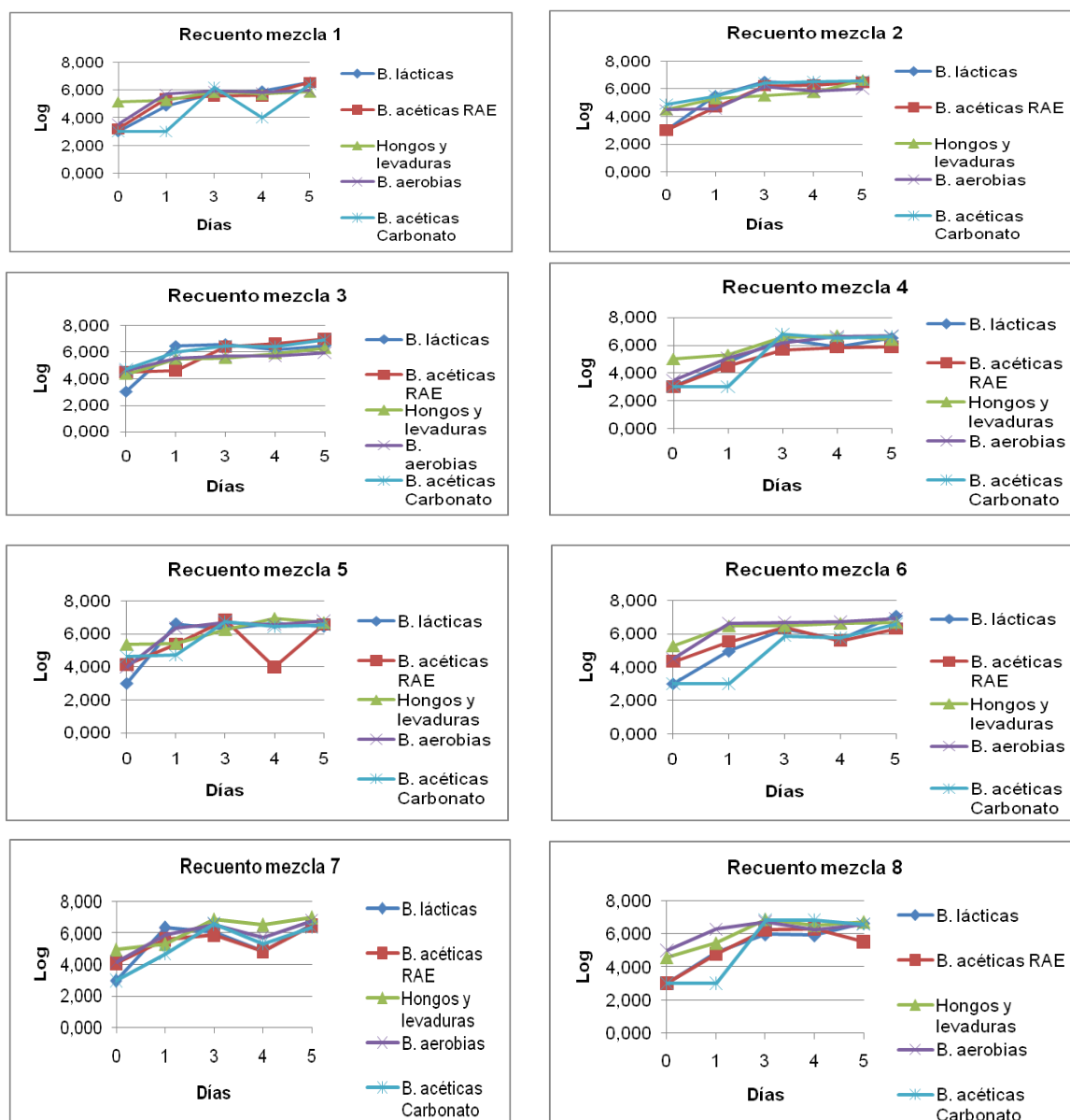


Figura N° 14. Recuento de microorganismos de las mezclas de bacterias acéticas, lácticas, aerobias, hongos y levaduras ensayo 3

El recuento se realizó en cuatro medios de cultivo MRS, RAE, PD y PC para las bacterias Lácticas, Acéticas, Hongos y Levaduras y Aerobias. Posteriormente se obtuvieron los datos en logaritmos (Log) y se graficaron.

En la gráfica de la mezcla 1 se observa crecimiento de bacterias aerobias, hongos, levaduras y a partir del día 1 de fermentación, manteniendo esta tendencia el día 3 y 4, en la mezcla 2 se observó que desde el día 3 hasta el día 5 de fermentación un mayor crecimiento de bacterias acéticas y lácticas todo lo contrario las bacterias aerobias mantienen un crecimiento menor durante el proceso al igual que los hongos y levaduras, solo en el día 5 los hongos y levaduras, presentaron un recuento elevado e incluso, mayor al de las bacterias acéticas y lácticas.

En la mezcla 3 los hongos y levaduras, presentaron crecimiento menor con respecto a las demás bacterias involucradas, en el proceso de fermentación, su crecimiento permite el inicio de la fermentación, transformando los azúcares, presentes en las semillas de cacao, en alcoholes, los cuales posteriormente fueron degradados a ácido acético y láctico, por acción de las bacterias acéticas y lácticas, que presentaron recuento ascendente desde el día 3 hasta el día 5.

(4) (5) (45)

La mezcla 4 en el día 3 de fermentación presentó aumento del recuento para todos los microorganismos, En el día 4 son los hongos y levaduras quienes continúan degradando los azúcares a alcoholes y las bacterias aerobias también presentan su máximo crecimiento, probablemente esto se debe a la elevación de la temperatura en los últimos días de fermentación como se observa en el gráfico de temperatura de este ensayo.

Para las mezclas 6, 7 y 8 en el día 5 de fermentación, se obtuvieron conteos mayores de hongos y levaduras, probablemente por el pH controlado en

aproximadamente 5.5. Las bacterias aerobias se ven muy favorecidas por el proceso exotérmico generado en el medio, debido al aumento en la temperatura. (45)

El cacao trinitario y criollo no presentó variaciones marcadas en el comportamiento de los conteos, ya que tanto para mezclas controladas y no controladas se mantiene similar tendencia en los recuentos.

Se pudo observar que en las mezclas controladas las bacterias lácticas presentaron mayor crecimiento que las bacterias acéticas.

En las mezclas no controladas las bacterias acéticas crecieron más que las bacterias lácticas, con esto se puede decir que el aumento de temperatura y pH favoreció el crecimiento de las bacterias lácticas.

5.5 Ensayo 4

5.5.1 Proceso de fermentación

En este ensayo solo nos limitamos a estudiar cacao criollo y trinitario, debido a que estos son más abundantes, en el cultivar San José del Real de La Carrera, esto con el objeto, de profundizar y comparar, con los demás ensayos.

En el siguiente cuadro se detalla el código que se asignó a cada mezcla según el tipo de cacao estudiado.

Cuadro N°23 Mezclas de tipos de cacao recolectadas ensayo 4

Código de Mezcla	Tipo de Cacao
MX 1	Cacao criollo
MX 2	Cacao criollo
MX 3	Cacao trinitario

Cada una de las mezclas 1, 2 y 3, se dividieron en 2 partes iguales respectivamente, ya que fue necesario estudiar cada mezcla, con dos diferentes cambios de temperaturas controladas y para ello se procedió de la siguiente manera:

Tabla N° 13. División de cada mezcla recolectada en dos partes

Muestra	1ª parte de muestra	2ª parte de muestra
MX 1	Mezcla 1.1	Mezcla 1.2
MX 2	Mezcla 2.1	Mezcla 2.2
MX 3	Mezcla 3.1	Mezcla 3.2

Finalmente se obtuvieron las 6 mezclas, para dicho estudio, como se detalla en la tabla N°13. Por ejemplo la mezcla 1 (MX1) se dividió en dos partes, una se asignó como mezcla 1.1 y la otra parte como mezcla 1.2, de igual manera se procedió para las mezclas 2 y 3.

Luego se colocaron las mezclas 1.1, 2.1 y 3.1 en baño maría a 30°C a partir del día 0 al día 2 y a 40°C del día 3 al día 5 de fermentación.

Las mezclas 1.2, 2.2 y 3.2 se colocaron en baño maría a 40°C a partir del día 0 al día 2 y a 50°C del día 3 al día 5 de fermentación.

Además en todas las mezclas se ajustó el pH a 5.5 con solución de Hidróxido de sodio 3N a partir del día 0 hasta el día 5. Esto con el objeto de comparar con los otros ensayos realizados.

5.5.2 Monitoreo de temperatura

Se monitoreo la temperatura en cada una de las 6 mezclas estudiadas en este ensayo; midiéndose en la parte inferior, central y superior del recipiente cada 24 horas, durante los 5 días de fermentación.

En la siguiente tabla se muestran los promedios de las temperaturas con su respectiva desviación estándar indicando que los datos se encuentran cercanos a la media aritmética.

Tabla N° 14. Promedios de temperatura de las mezclas en fermentación ensayo 4.

Temperatura ° C						
	Día 0	Día 1	Día 2	Día 3	Día 4	Día 5
Mezcla 1.1	30,00±0,00	30,50±0,05	29,60±0,09	30,50±0,05	42,47±0,05	36,40±0,05
Mezcla 1.2	40,00±0,00	40,10±0,05	34,10±0,12	36,90±0,08	36,17±0,09	44,20±0,05
Mezcla 2.1	30,00±0,00	30,10±0,08	29,00±0,09	28,83±0,09	44,23±0,05	36,10±0,05
Mezcla 2.2	40,00±0,00	38,00±0,05	36,63±0,09	40,13±0,12	37,60±0,05	46,70±0,05
Mezcla 3.1	30,00±0,00	30,00±0,05	28,57±0,09	29,73±0,05	45,00±0,05	36,30±0,08
Mezcla 3.2	40,00±0,00	40,00±0,05	36,30±0,05	38,73±0,05	45,10±0,05	47,13±0,12

Al final se obtuvo un promedio de las tres mediciones realizadas, siendo este el que aparece en la gráfica de temperatura que se muestra a continuación.

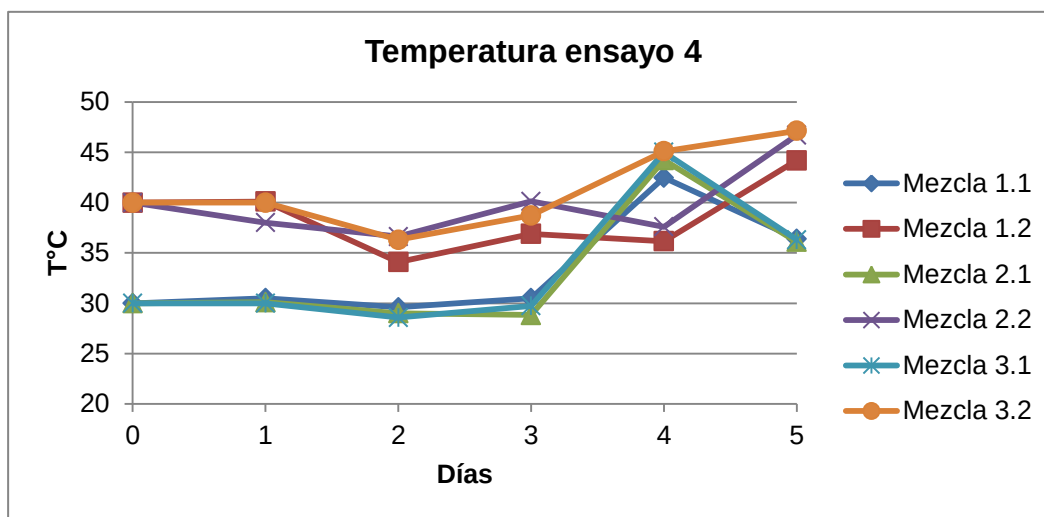


Figura N° 15. Resultados obtenidos de temperatura en las mezclas en fermentación ensayo 4.

Las mezclas controladas a 30°C en el inicio de la fermentación, mantuvieron una tendencia similar a partir del día 0 al día 3, luego a partir del día 4 se eleva por encima de los 40°C. Para finalizar el día 5 disminuyó la temperatura y se presentó un rango entre 36,1 y 36,4, esto como consecuencia de la acción de bacterias acéticas y lácticas y por tanto disminuyendo el proceso exotérmico.

Las mezclas controladas a 40°C los días 0 y 1 se mantuvieron casi constantes, en el día 2 disminuyó la temperatura entre 4 y 6 °C comparado con los primeros días. En el día 3 y 4 se mantuvo la misma tendencia del día 2 a excepción de la mezcla 3.2 que corresponde a cacao trinitario, elevándose a 45,1°C y siguió aumentando hasta el día 5. Las mezclas 1,2 y 2,2 aumentaron en el día 5 su temperatura a un valor de 44,2 y 46,7 respectivamente.

Debido a estas condiciones de temperatura controlada se logró obtener mejores características en el fermento generando aroma agradable y coloración marrón intensa en el medio.

5.5.3 Medición de pH

Se midió el pH en cada una de las seis mezclas estudiadas en este ensayo; midiéndose en la parte inferior, central y superior del recipiente cada 24 horas, durante los cinco días de fermentación. Durante todo el proceso de fermentación luego de medir el pH se ajustaba a 5,5.

En la siguiente tabla se muestran los promedios de pH con su respectiva desviación estándar indicando que los datos se encuentran cercanos a la media aritmética.

Tabla N° 15. Promedios de pH en las mezclas de fermentación ensayo 4

	pH					
	0	1	2	3	4	5
Mezcla 1.1	5,52±0,014	4,43±0,021	4,02±0,012	4,27±0,008	5,32±0,022	4,81±0,005
Mezcla 1.2	5,52±0,017	4,61±0,008	3,91±0,009	3,92±0,012	4,77±0,016	5,40±0,005
Mezcla 2.1	5,57±0,017	4,68±0,005	4,26±0,012	4,41±0,012	5,41±0,008	5,42±0,000
Mezcla 2.2	5,51±0,009	4,69±0,005	4,55±0,012	4,12±0,016	4,27±0,008	4,96±0,005
Mezcla 3.1	5,33±0,125	4,31±0,012	4,07±0,017	4,45±0,005	5,32±0,005	5,31±0,005
Mezcla 3.2	5,53±0,047	4,71±0,012	4,69±0,005	4,01±0,008	4,26±0,016	5,07±0,094

Al final se obtuvo un promedio de las tres mediciones realizadas, siendo este el que aparece en la gráfica de pH que se muestra a continuación.

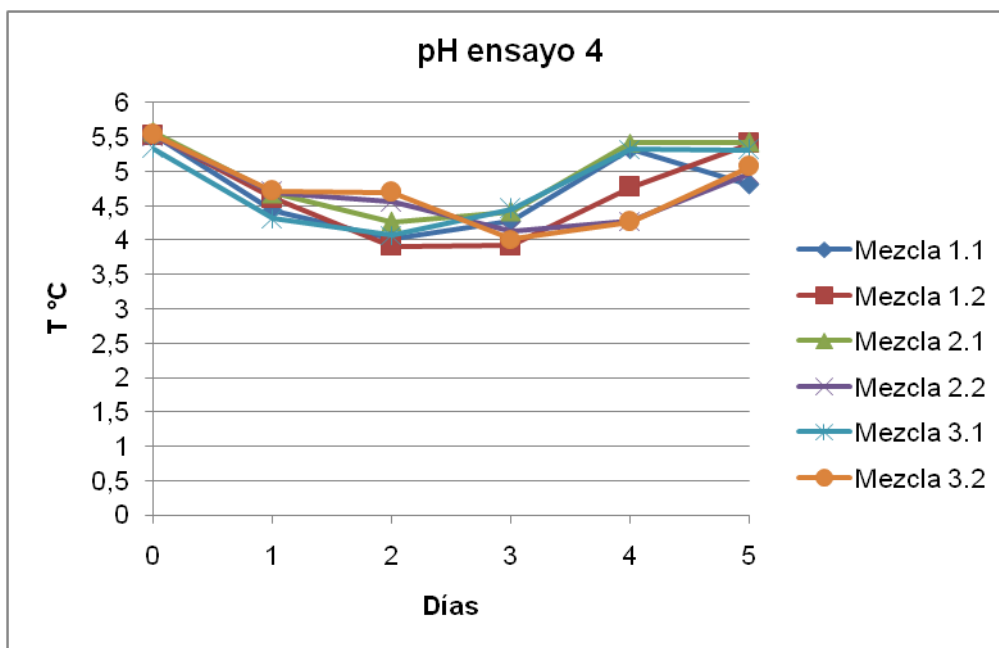


Figura N° 16. Gráfica de resultados obtenidos de pH ensayo 4.

Según la figura N° 16 el pH presentó una disminución a partir del día 1 y siguió esta tendencia hasta el día 3. En el día 4 el pH aumentó y mantuvo esta tendencia hasta el día 5, finalizando el proceso con un rango entre 4,81 y 5,42, a pesar que el pH se controlaba cada día a un valor de 5.5 este disminuía. Esta disminución en el pH, se debió a la acidez otorgada al medio, por la formación de componentes ácidos, a partir de las bacterias acéticas y lácticas. También se pudo observar que en el día 4 solo las mezclas 1.1, 2.1 y 3.1 presentaron un pH en un rango de 5,32 a 5,41 muy cercano al valor de pH controlado. En el día 5 a excepción de las mezclas 1.1 y 2.2 el valor de pH fue menor a 5, las demás mezclas presentaron un pH en un rango de 5,07 a 5,42 próximo al valor controlado.

5.5.4 Índice de fermentación

Para el índice de fermentación se utilizaron semillas de las mezclas de fermentación, tomadas a partir del día 0 al día 5 de fermentación, obteniéndose promedios de los datos como se muestra en la tabla 16. Para esto se realizaron lecturas por triplicado de cada mezcla.

Tabla N° 16. Resultados de índice de fermentación de las mezclas en fermentación ensayo 4.

Índice de fermentación						
	Día 0	Día 1	Día 2	Día 3	Día 4	Día 5
Mezcla 1.1	0,386 ±0,002	0,386 ±0,003	0,455 ±0,001	0,513 ±0,009	0,734 ±0,016	1,471 ±0,029
Mezcla 1.2	0,508 ±0,010	0,422 ±0,002	0,505 ±0,001	0,751 ±0,005	0,685 ±0,026	1,495 ±0,067
Mezcla 2.1	0,434 ±0,001	0,438 ±0,001	0,355 ±0,003	0,478 ±0,000	0,626 ±0,005	1,297 ±0,002
Mezcla 2.2	0,442 ±0,008	0,390 ±0,002	0,976 ±0,028	0,740 ±0,014	0,763 ±0,009	1,287 ±0,015
Mezcla 3.1	0,447 ±0,007	0,496 ±0,007	0,450 ±0,010	0,569 ±0,017	0,663 ±0,004	1,469 ±0,008
Mezcla 3.2	0,462 ±0,002	0,493 ±0,003	0,523 ±0,013	0,793 ±0,028	0,675 ±0,010	1,446 ±0,011

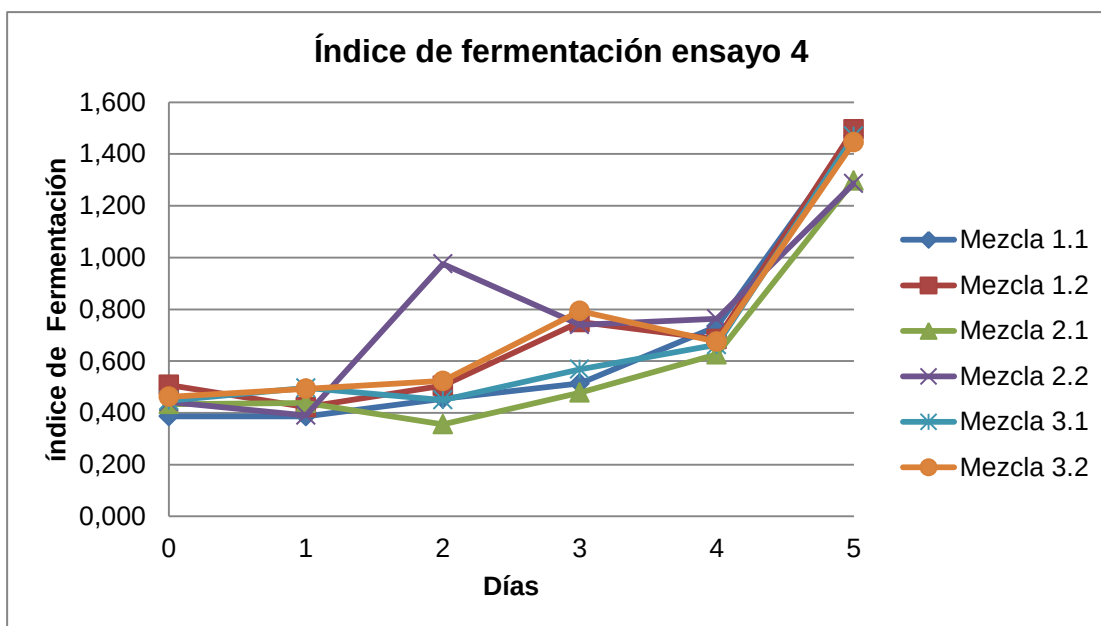


Figura N° 17. Resultados obtenidos de índice de fermentación de las mezclas en fermentación ensayo 4

En la figura N° 17, se observó que todas las mezclas alcanzaron una fermentación completa de las semillas de cacao, hasta el día 5, obteniéndose valores arriba de 1.

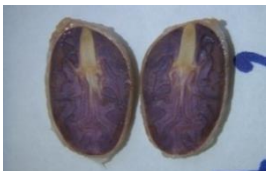
Índices de fermentación con valores entre 1 a 1,5 son los requeridos, para garantizar que el proceso de fermentación, sea el adecuado, según los resultados obtenidos todas las mezclas fueron fermentadas y no se observó variaciones según el tipo de cacao, por lo tanto de 4 y 5 son los días necesarios, que se deben dejar fermentar las mezclas.

En los siguientes cuadros, se detallan las fotografías que muestran, los cambios de coloración en las semillas de cacao fermentadas, al inicio y al final del proceso.

Cuadro N°24 Fotos de semillas fermentadas mezclas 1.1 y 1.2 ensayo 4.

Días de fermentación	Mx 1.1 a 30°C	Mx 1.2 a 40°C
Día 0 de fermentación		
Día 1, 24 horas de fermentación		
Día 2, 48 horas de fermentación		
Días de fermentación	Mx 1.1 a 40°C	Mx 1.2 a 50°C
Día 3, 72 horas de fermentación		
Día 4, 96 horas de fermentación		
Día 5, 120 horas de fermentación		

Cuadro N°25 Fotos de semillas fermentadas mezclas 2.1 y 2.2 ensayo 4

Días de fermentación	Mx 2.1 a 30°C	Mx 2.2 a 40°C
Día 0 de fermentación		
Día 1, 24 horas de fermentación		
Día 2, 48 horas de fermentación		
Día 3, 72 horas de fermentación		
Día 4, 96 horas de fermentación		
Día 5, 120 horas de fermentación		

Se puede observar en las fotografías de semillas de cacao fermentado, que al inicio presentaron coloración violeta intenso, debido a que poseen alto contenido de compuestos fenólicos que le transfieren dicha coloración, al final del proceso las semillas se observan violeta menos intenso, e incluso en algunas mezclas la coloración se torno marrón suave, indicándonos la disminución de los componentes fenólicos.

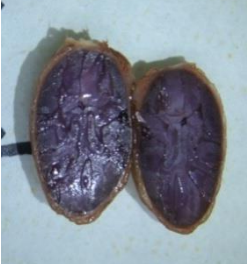
Cuadro N°26 Fotos de semillas fermentadas mezclas 3.1 y 3.2 ensayo 4

Días de fermentación	Mx 3.1 a 40°C	Mx 3.2 a 50°C
Día 0 de fermentación		
Día 1, 24 horas de fermentación		
Día 2, 48 horas de fermentación		

En las fotografías, se puede observar los cambios de coloración, que las semillas presentaron, durante el proceso de fermentación.

Al inicio del proceso tenían un color violeta oscuro, al finalizar la fermentación, las semillas de cacao se tornaron violeta suave (violeta pálido) incluso el color tiende a ser marrón, en el día 5 de fermentación.

Cuadro N°27 Fotos de semillas fermentadas mezclas 3.1 y 3.2 ensayo 4

Días de fermentación	Mx 3.1 a 40°C	Mx 3.2 a 50°C
Día 3, 72 horas de fermentación		
Día 4, 96 horas de fermentación		
Día 5, 120 horas de fermentación		

Este cambio en la coloración, denota que disminuyó la presencia de compuestos fenólicos, en las semillas, ya que en una coloración violeta intensa, hay mayor cantidad de compuestos fenólicos. La disminución de estos compuestos, permite reducir el sabor amargo en el chocolate.

Debido a que las semillas, se tomaron al azar, para observar su coloración, existe la probabilidad, de haber tomado una parcialmente fermentada, en lugar de una totalmente fermentada.

Los recipientes de fermentación, representados en el cuadro N° 28 y 29, contienen las mezclas 1.1, 1.2 y 3.1, 3.2 respectivamente del ensayo 4.

El recipiente de la izquierda, inició su fermentación a 30°C y a partir del día 3, se aumento la temperatura a 40°C; el recipiente de la derecha inició su fermentación a 40°C y se aumento la temperatura a 50°C a partir del día 3 de fermentación. Debido a esto, en el día 4 y 5, se observa que aparece la fotografía de ambos recipientes, con la temperatura elevada en 10°C, respecto al inicio de la fermentación.

En los cuadros N° 28 y 29 se presentan las mezclas al inicio del proceso, luego se observa un cambio cada día que transcurre dicho proceso; los últimos días de fermentación existe un cambio notorio en cuanto a mayor consistencia y aparición de un color marrón. El olor característica a guineo y a cacao fermentado se acentúa más en los días 4 y 5.

En cuanto a las diferentes temperaturas, no se observa cambio drástico en color, olor y consistencia.

Cuadro N° 28. Fermentación de mezclas 1.1 y 1.2 ensayo 4

Día de fermentación	Muestras a 30°C y 40°C respectivamente
Día 0, mezclas listas para iniciar la fermentación	
Mezclas fermentadas día 1	
Día 2, mezclas se observa un cambio de color más pronunciado	
Día 3 de fermentación	

Cuadro N° 28. Continuación

Día de fermentación	Muestras a 40°C y 50°C respectivamente
Día 4 las mezclas presentan un cambio de color y consistencia	
Día 5, mezclas fermentadas	

Al comparar el color, aroma y consistencia con las mezclas del ensayo 1 y 2 se concluye que al aumentar la temperatura a 40°C y 50°C, se obtienen muestras color marrón, mejor aroma a cacao fermentado y la consistencia es más viscosa. (Ver anexo N° 8)

Cuadro N° 29. Fermentación de mezclas 3.1 y 3.2 ensayo 4

Día de fermentación	Muestras a 30°C y 40°C respectivamente
Día 0, mezclas listas para iniciar la fermentación	
Día 1, mezclas fermentada a 30°C y 40°C	
Día 2, se observa un cambio de color más pronunciado a 40°C	
Día 3, 72 horas de fermentación	

Cuadro N° 29. Continuación

Día de fermentación	Muestras a 40°C y 50°C respectivamente
Día 4, las mezclas presentan un cambio de color y consistencia	
Día 5, mezclas fermentadas	

5.5.5 Recuento de microorganismos

El recuento se realizó en cuatro medios de cultivo MRS, RAE, PD y PC para las bacterias Lácticas, Acéticas, Hongos y Levaduras y Aerobias.

En las siguientes fotografías, se presentan placas con cultivos, de bacterias aerobias, lácticas, acéticas hongos y levaduras.

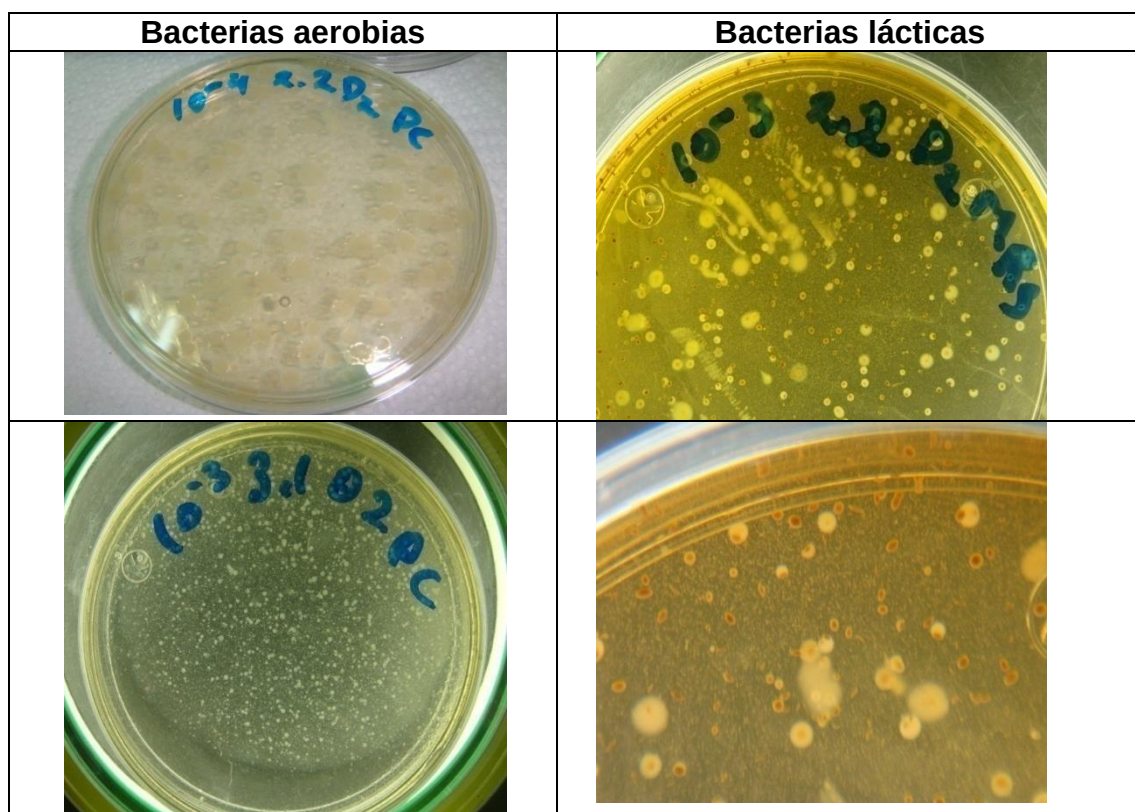


Figura N° 18. Placas de cultivo con microorganismos presentes en el proceso de fermentación

Las placas que se muestran son con las características morfológicas macroscópicamente de los cuatro tipos de microorganismos, que se estudiaron en los cuatro ensayos; realizándoles su respectiva cuantificación.

Para las bacterias aeróbicas se utilizó el medio plate count, para las bacterias lácticas se uso medio MRS, para los hongos y levaduras se uso medio papa dextrosa y en las bacterias acéticas se emplearon dos medios RAE y Carbonato, este último medio es muy importante, debido a que también, es un medio de identificación y se caracteriza, por formar un halo transparente, alrededor de las colonias de bacterias acéticas.

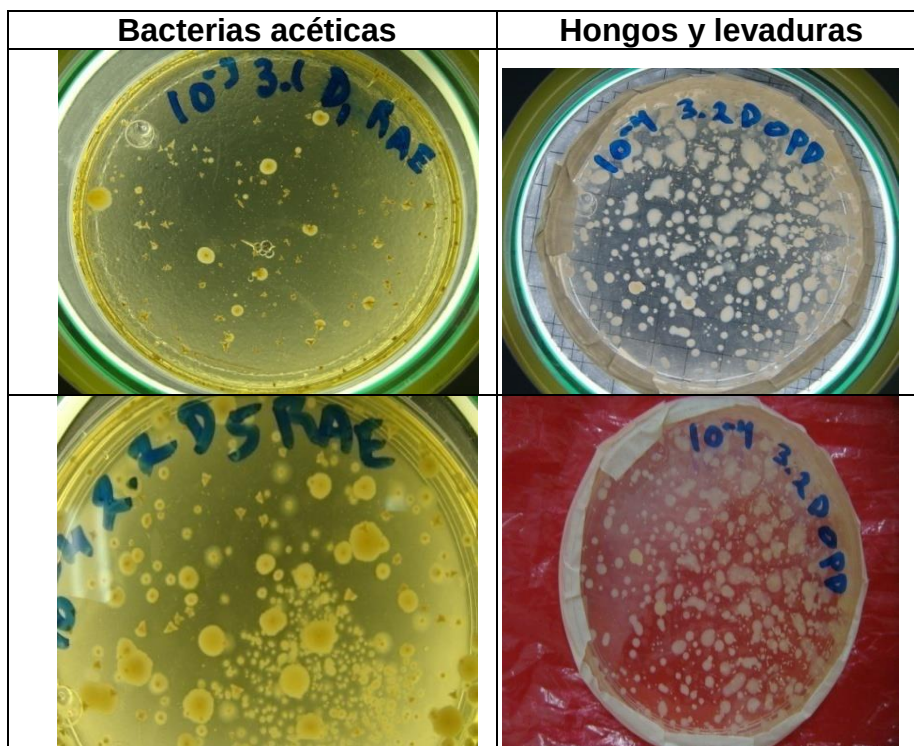


Figura N° 19. Placas con cultivos de microorganismos presentes en el proceso de fermentación.



Figura N° 20. Placas con cultivos de bacterias acéticas presentes en el proceso de fermentación

En las gráficas de la figura N° 21 de las mezclas 1.1, 2.1 y 3.1, que se encuentran controladas a temperatura de 30°C del día 0 al 2 y a partir del día 3 al 5 se controlan a 40°C y las mezclas 1.2, 2.2 y 3.2 que se controlaron a 40°C del día 0 al 2 y a partir del día 3 al 5 se controlaron a 50°C. Todas a pH 5.5. Se obtuvo su logaritmo (Log) a partir de los datos de recuento en UFC/mL y posteriormente se graficaron.

Se observó crecimiento similar, durante todo el proceso de fermentación para todas las bacterias involucradas, solamente los hongos y levaduras presentaron crecimiento mayor el día 3, en el día 4 su recuento bajó debido a la elevación de la temperatura generando un proceso exotérmico esto permitió que en el día 5 se elevó el crecimiento de bacterias lácticas y aerobias.

Las mezclas 1.1, 2.1 y 3.1, en el día 5 presentaron un mayor crecimiento de bacterias lácticas, aerobias, hongos y levaduras.

Bacterias aeróbicas y lácticas en muestras 1.2, 2.2 y 3.2 presentan mayor crecimiento el día 5 de fermentación, probablemente la elevación de la temperatura produzca estos resultados.

No existe diferencia marcada en los resultados obtenidos al fermentar cacao trinitario o criollo a diferentes temperaturas, se obtienen resultados similares en los recuentos.

A continuación se presentaran las gráficas de recuento de microorganismos de las mezclas ensayo 4

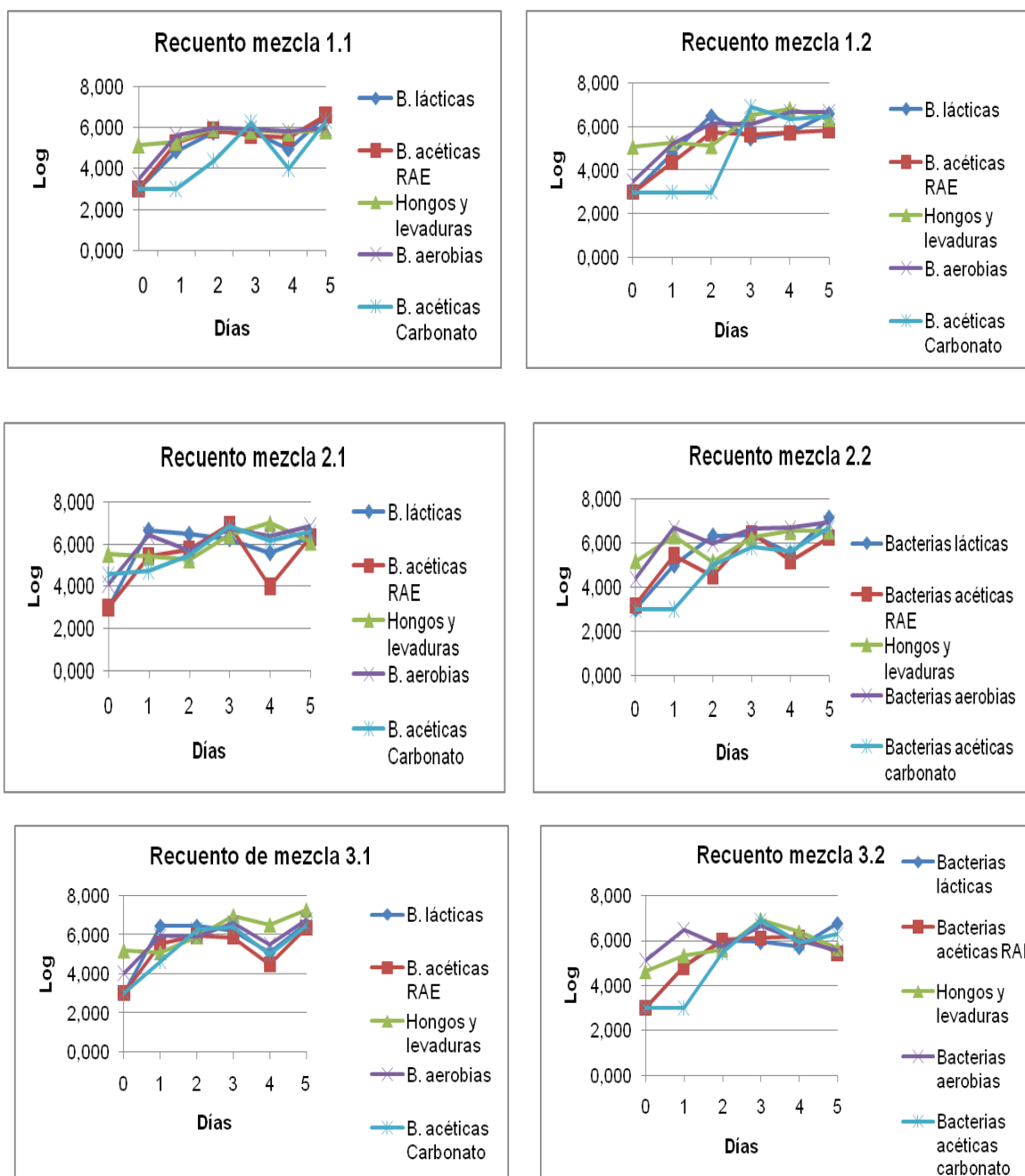


Figura N° 21. Recuento de microorganismos de las mezclas en fermentación de bacterias lácticas, acéticas, aerobias, hongos y levaduras ensayo 4.

5.6 Identificación de microorganismos

5.6.1 Identificación de colonias de bacterias acéticas

Para el recuento de este tipo de bacterias, los medios que se utilizaron fueron: Carbonato y RAE.

5.6.1.1 Medio carbonato de calcio

Este medio al poseer las cantidades de carbohidratos adecuados, proporcionó la fuente de energía necesaria, para el crecimiento de las bacterias acéticas; en los resultados obtenidos, se observaron colonias pequeñas, bien definidas de forma elipsoidal y cilíndrica, color blanco. Estas colonias definidas, tienen la capacidad, para crecer en medio ácido y presentan un metabolismo estrictamente aerobio. (6)

Las siguientes fotografías, pertenecen a placas incubadas, durante el ensayo en el laboratorio, con medio carbonato, observándose colonias que presentan un halo transparente, a su alrededor, característico para identificación de estas bacterias (6)

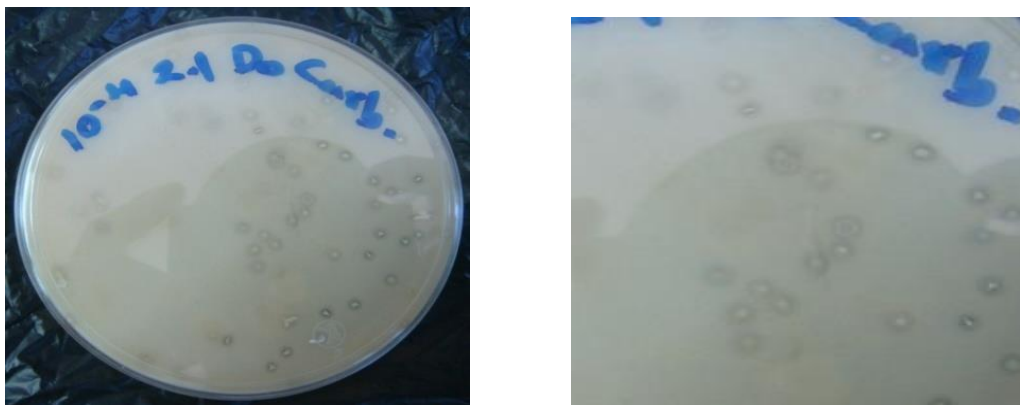


Figura N° 22 Representa colonias de bacterias acéticas presentes en el proceso de fermentación incubadas en medio carbonato de calcio.

El halo obtenido es de aproximadamente 1 mm de espesor.

5.6.1.2 Medio RAE

Se observó crecimiento de bacterias acéticas a partir de los días 4 y 5 de incubación en las placas, ya que el medio de cultivo, contiene los componentes necesarios para ello, evitando el crecimiento de otros microorganismos, lo que lo convierte en un medio selectivo muy particular. Se observó colonias blancas y amarillosas de consistencia cremosa y de forma elipsoidal y otras cilíndricas, características de las bacterias acéticas. (22)



Figura N° 23 Representa colonias de bacterias acéticas, presentes en el proceso de fermentación incubadas en medio RAE.

Estas placas fueron incubadas con medio RAE, durante el ensayo realizado en el proceso de fermentación. Sus características y morfología macroscópica, pertenecen a dichas bacterias. (22)

5.6.2 Identificación de colonias de Hongos y levaduras.

5.6.2.1 Medio agar papa dextrosa.

Se usó este medio de cultivo, porque es muy utilizado para analizar materia prima de uso comestible (cacao), ya que es capaz de aislar todo tipo de hongos y levaduras, presentes en una muestra de alimentos.

Las levaduras que presentaron crecimiento en el medio a partir del día 3 y 4 de incubación, se observaron como colonias abundantes, de color amarillo y

blanco, con una consistencia pastosa y cremosa. Los hongos presentaron un crecimiento menos abundante que las levaduras a partir del día 3 y 4 de incubación y se observaron como colonias difusas, de aspecto esponjoso, algodonoso, voluminoso, morfología variada como esférica, ovaladas, alargadas, pero más predominante el color amarillo suave. (34) (44)

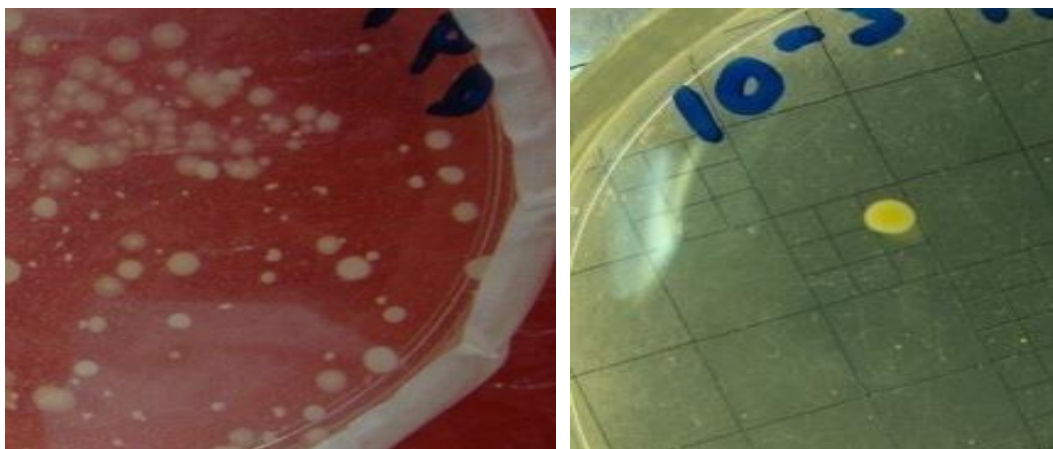


Figura N° 24 Representa colonias de hongos y levaduras, presentes en el proceso de fermentación incubadas en medio papa dextrosa.

5.6.3 Identificación de colonias de bacterias lácticas

5.6.3.1 Medio MRS

El Agar MRS es un medio, evidenció el crecimiento de lactobacilos y otras bacterias ácido láctico a partir del día 3 y 4 de incubación de las placas.

Este medio de cultivo por sus componentes como extracto de Levadura, Peptona, Glucosa, y otros elementos necesarios para el crecimiento bacteriano; que permitió un abundante desarrollo, de las especies de lactobacilos. (21) (22)

En los cultivos obtenidos de la fermentación, se observaron colonias circulares abundantes, pero generalmente pequeñas, de color blanco-grisáceo y otras colonias presentaron un color café, de aspecto liso y cremoso, con metabolismo

Anaerobio facultativo y con alta capacidad de fermentar los azúcares presentes en el medio.

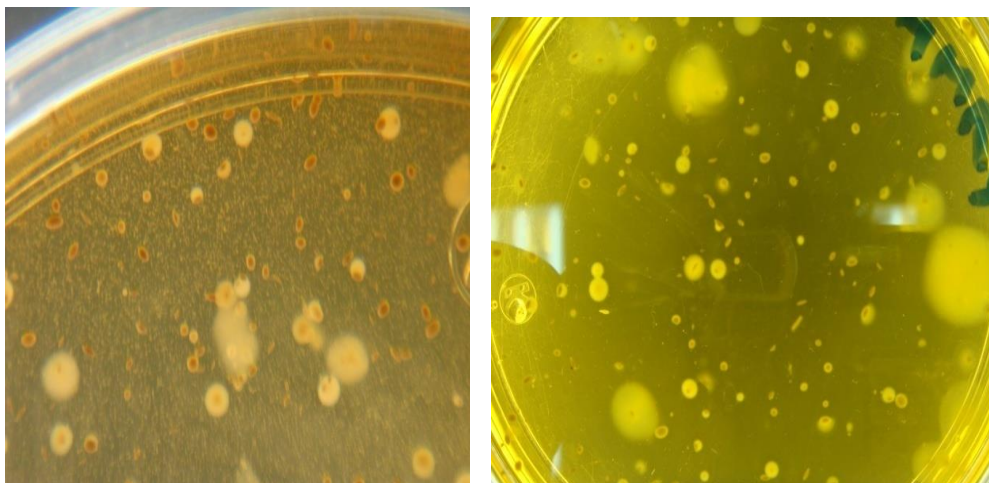


Figura N° 25. Representa colonias de bacterias ácido láctico, presentes en el proceso de fermentación, incubadas en medio MRS.

5.6.4 Identificación de colonias de bacterias aerobias.

5.6.4.1 Medio plate count.

Medio utilizado para el examen bacteriológico de comida, agua, leche y otros productos lácteos.

Este medio proporcionó fuente de energía a las bacterias aerobias, permitiendo su crecimiento a partir del día 1 y 2 de incubación de las placas.

Las bacterias aerobias requieren oxígeno, para su crecimiento y supervivencia. En los resultados obtenidos, se observaron como pequeñas colonias abundantes, de morfología circular de apariencia cremosa y color amarillo suave a blanco. (34) (7) (17)

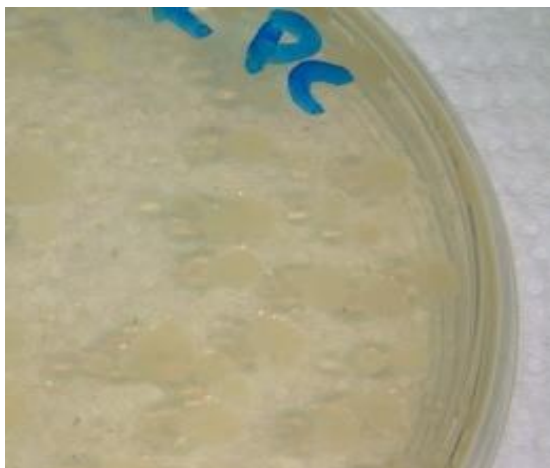


Figura N° 26. Representa colonias de bacterias aerobias, presentes en el proceso de fermentación, incubadas en medio plate count.

5.7 Tinción al gram.

Las colonias obtenidas en cada medio de cultivo, se identificaron como bacterias acéticas, hongos, levaduras, lácticas y aerobias según la morfología observada y el medio específico para cada bacteria, de estas colonias se tomó la colonia más característica y se le realizó tinción al gram. Luego se observaron las tinciones en el microscopio. (17) (34)

5.7.1 Hongos y levaduras.

En la primera fase del proceso de fermentación, están involucradas las bacterias como los hongos y las levaduras, los cuales inician la degradación de los azúcares y el consumo del oxígeno del medio. (17) (34)

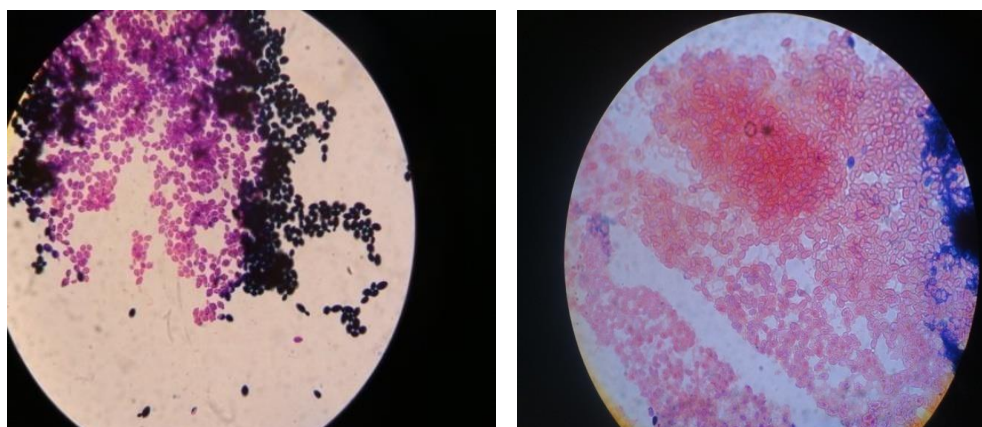


Figura N° 27. Fotografías que muestran microscópicamente, las levaduras obtenidas durante el proceso de fermentación.

La figura N° 27 muestra la morfología microscópica de las levaduras, en color rosado en su mayoría, con forma microscópica ovalada, alargada o esférica, formando colonias húmedas, cremosas, opacas y otras con aspecto pastoso (34).

5.7.2 Bacterias lácticas.

En la muestra tomada se puede observar, la presencia de *Lactobacillus*, que presenta una morfología de bacilos Gram positivos de color azul a morado, células alargadas en pares o en cadenas.

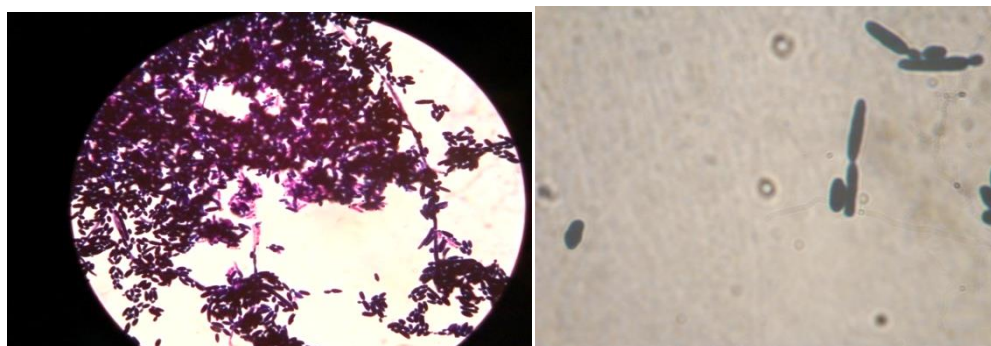


Figura N° 28. Representa fotografías microscópicas de lactobacilos gram positivos, involucrados en el proceso de fermentación

5.7.3 Bacterias acéticas.

En la muestra tomada se puede observar, la presencia de bacterias acéticas, gram negativas de color rosado, con forma elíptica o de bastón corto, estas se observaron agrupadas en pares o en cadenas, observándose inmovilidad y en otras movilidades debido a la presencia de sus flagelos. (34)

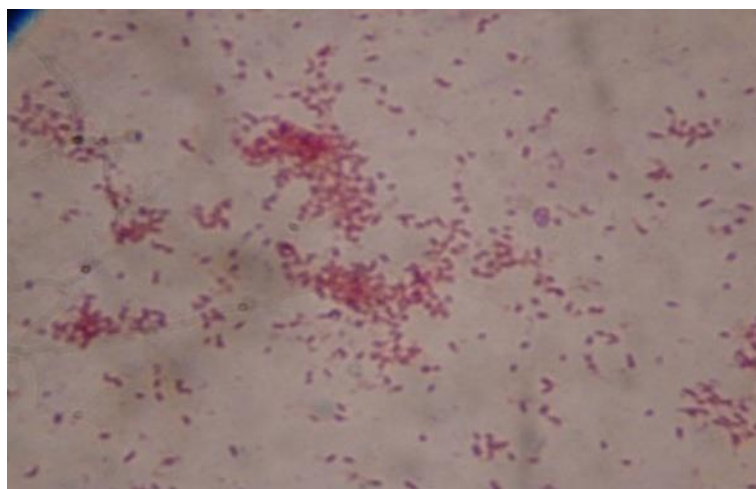


Figura N° 29. Representa fotografía microscópica de bacterias acéticas, gram positivas, involucradas en el proceso de fermentación.

5.7.4 Bacterias aerobias.

La tinción de colonias incubadas con medio Plate Count, muestra bacterias gram positivas como gram negativas, ya que se observaron tanto bacterias que se tiñen de rosado como de color morado, según se muestra en la fotografía tomada del microscopio.

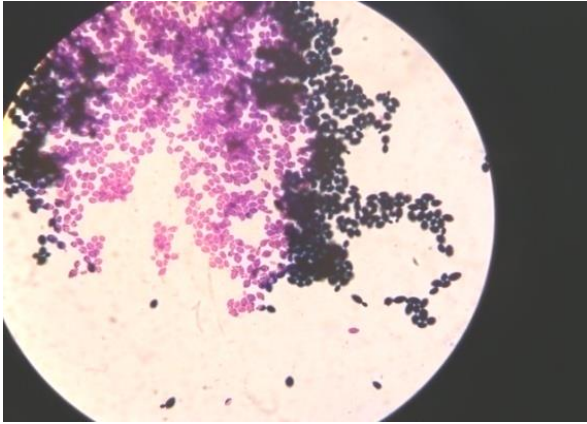


Figura N° 30. Representa fotografías microscópicas de bacterias aerobicas, gram positivas y gram negativas, presentes en el proceso de fermentación.

CAPITULO VI
CONCLUSIONES

6.0 CONCLUSIONES

1. El rango de pH de las semillas de cacao, es similar para todas las mezclas; no se observa variación marcada, según el tipo de cacao presente, ni por la combinación de diferentes tipos de cacao.
Solo aquellas muestras que se les controló el pH a 5.5, obtuvieron un resultado más alto, comparado con las no controladas.
2. En las muestras que no se controló temperatura y pH, este último disminuyó al final de la fermentación, debido a que en el proceso, intervienen bacterias acéticas y lácticas, capaces de formar ácido acético y láctico, a partir del azúcar, presente en las semillas de cacao. (6) (38)
3. La temperatura se mantuvo en una tendencia bastante similar sin importar el porcentaje o tipo de cacao utilizado en las mezclas de los cuatro ensayos realizados.
4. Las mezclas que se trabajaron a temperatura de laboratorio (23°C), y a temperatura y pH controlado, no se vieron afectadas, en relación a los datos obtenidos en el índice de fermentación, en ambos ensayos se obtuvieron valores de 1 o mayores a 1.
5. Se presentaron cambios físicos, en cuanto a color, olor y consistencia, en las muestras con temperatura y pH controlado, se obtuvo aroma más intenso (olor agradable a cacao bien fermentado y a guineo) y color marrón oscuro (caramelizado). Las no controladas, presentaron color marrón poco intenso y aroma suave a cacao fermentado. Esto se presentó debido a que el mucílago, se fermentó en su mayoría, la consistencia en las muestras controladas fue más viscosa.

6. El valor de índice de fermentación para cada muestra, varió en el rango aceptable (1,0-1,5), debido a esto se concluye, que entre el día cuatro y cinco, se alcanzó los valores requeridos, que caracterizan una buena fermentación sin encontrarse variación en los tres tipos de cacao. Solo la mezcla 4 en el ensayo N° 1 presentó un valor inferior a 1.
7. En general las muestras que alcanzaron un índice de fermentación cercano a 1,5 presentaron en su mayoría, alto recuento de bacterias lácticas y acéticas, comparado con los demás microorganismos involucrados en el proceso de fermentación.
8. En los recuentos de microorganismos, realizados durante el proceso de fermentación, se observó que en los días 3, 4 y 5, se alcanza un aumento en el crecimiento de hongos y levaduras, además este se ve aumentado, en muestras con temperatura y pH no controladas, debido a que los hongos y levaduras, crecen mejor a una temperatura cercana a la ambiente.
9. En el día cinco de fermentación, la temperatura presentó un incremento en las muestras fermentadas, esto permitió el crecimiento de las bacterias lácticas y aeróbicas, favoreciendo el proceso exotérmico del medio. En las muestras no controladas, en el día cinco de fermentación, se observó un mayor crecimiento, de bacterias acéticas y lácticas.
10. Se determinó que el proceso de fermentación, de las semillas de cacao, según los cuatro ensayos realizados, debe tener un tiempo de entre 4 y 5 días, para obtener un cacao con fermentación adecuada.

CAPITULO VII
RECOMENDACIONES

7.0 RECOMENDACIONES

- 1- Que el personal del área de investigación, y estudiantes egresados de la facultad de Química y Farmacia, deberían investigar más a fondo, los procesos de fermentación de las semillas de cacao, con temperatura y pH controlado, analizando estas variables por separado y unidas.
- 2- Elaborar el licor de cacao a partir de semillas de cacao fermentado, tanto con muestras trabajadas con temperatura y pH controlado y sin controlar estas variables, para verificar que muestras, presentan mejores características de olor, sabor y color.
- 3- Que el personal del área de investigación y estudiantes egresados de Química y Farmacia de la Universidad de El Salvador, desarrollen la caracterización molecular, de las bacterias involucradas en el proceso de fermentación.
- 4- Que el personal del área de investigación y estudiantes egresados de Química y Farmacia de la Universidad de El Salvador, estudien las bacterias presentes en el licor de cacao, realizando identificación y recuento, con el objeto de conocer la carga microbiana presente en este producto.
- 5- Que el personal del área de investigación y estudiantes egresados de la facultad de Química y Farmacia de la Universidad de El Salvador, investiguen la probabilidad de utilizar cepas de microorganismos en de fermentación de cacao, para acelerar este proceso con el objeto de reducir costos y tiempo en la industria.

- 6- Se debe profundizar el estudio del cacao en el país, con el objeto de ser más competitivos tanto a nivel nacional como internacional.

BIBLIOGRAFIA

1. Alas Castro JJ, Ríos Canales RA. “Evaluación del proceso de fermentación tradicional y no tradicional de la semilla de cacao *Theobroma cacao* de 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”. Facultad de Agricultura e Investigación Agrícola, Universidad Dr. José Matías Delgado. Disponible en: <http://webquery.ujmd.edu.sv/siab/bvirtual/BIBLIOTECA%20VIRTUAL/ TESIS/04/IAL/0001701-ADTESAE.pdf>
2. Álvarez C, de Farias A, García H, Girón C, Morillo F, Sánchez P, Tovar L. Evaluación de la calidad comercial del grano de cacao (*Theobroma cacao* L.) usando dos tipos de fermentadores. UDO Agrícola [revista en línea] 2010. [Consultado 12 de febrero de 2013]. 10(1): 76-87. Disponible en: <http://www.bioline.org.br/pdf?cg10010>
3. Arenivar BI, Gutiérrez CE. Diseño de estrategia para mejora de procesos de industrialización y diversificación de productos del cacao en la asociación cooperativa de producción agrícola Hacienda “La Carrera”, en el Departamento de Usulután. Marzo de 2009. Universidad “Dr. José Matías Delgado”. Trabajo de Graduación. Disponible en: <http://www.yumpu.com/es/document/view/12747193/universidad-dr-jose-matias-delgado-biblioteca-ujmd->
4. Barragan A.A, Rey Forero LC. Proyecto Establecimiento de los nucleos productivos de cacao (*Theobroma cacao*) en torno a microcentrales de beneficios para mejorar la calidad del grano en la región del distrito

agroindustrial Magdalena Caldense. 2004. Universidad de Colombia. Sede Manizales. Disponible en:
<http://www.bdigital.unal.edu.co/1044/1/alfonsoantoniobarragan.2004.pdf>

5. Bercian de Mendoza J. Mata Conrado DV. Universidad Dr. José Matías Delgado. Evaluar y determinar los factores físicos-químicos microbiológico sobre el índice de fermentación tradicional y no tradicional del grano de cacao (Theobroma cacao) Forastero cultivado en la hacienda san jose del real la carrera- Usulután. 2012. Disponible en:
<http://webquery.ujmd.edu.sv/siab/bvirtual/BIBLIOTECA%20VIRTUAL/TE SIS/04/IAL/0001702-ADTESBE.pdf>
6. Blanco Camba P. Microorganismos en la industria enológica y su relación con la calidad del vino. Disponible en:
http://www.mediururalemar.xunta.es/fileadmin/archivos/investigacion/transferencia_tecnologica/calidademb.pdf
7. Bray J. El comienzo de la fermentación. Disponible en:
http://www.canacacao.org/uploads/smartsection/19_Fermentacion_por_Juliet_Bray.pdf
8. Díaz Ponce SL. Pinoargote Chang MH. Análisis de las características organolépticas del chocolate a partir de cacao CCN51 Tratado enzimáticamente y tostado a diferentes temperaturas.. Guayaquil. Ecuador. Año 2012. Disponible en:
http://www.dspace.espol.edu.ec/bitstream/123456789/21432/1/Tesis_terminada_chocolate%20FINAL%20totalmente%20corregida-2.pdf

9. Disponible en:

http://www.botconsult.com/downloads/Hoja_Botanica_Cacao_2012.pdf
[consultado el 15.06.2014] Cacao 7

10. Disponible en:

<http://www.mexicomaxico.org/dadivas/cacao.htm>. [consultado el 15.06.2015]. El cacao.

11. Disponible en:

<http://www.mincetur.gob.pe/comercio/otros/penx/pdfs/Cacao.pdf>.
[Consultado el 20.07.2014]. El cacao en el mundo.

12. Disponible en:

http://www.escacao.com/Presentation_National_Cacao_Day_El_Salvador_3.html. [Consultado el 02.07.2014]. El cacao en El Salvador en el siglo XX y comienzo del XXI.

13. Disponible en:

<https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/f/fd/FermentaciondeCacao.pdf>. [Consultado el 02.07.2014] Fermentación de cacao.

14. Disponible en:

http://www.slideshare.net/Cientifica_del_Sur/fermentacin-del-cacao-para-optimizar-la-industria-del-chocolate. Fermentación del cacao para optimizar la industria del chocolate. 2012.

15. Disponible en:

<https://sites.google.com/site/postcosechacacao/Home/0-vamos-a-iniciar>.
[Consultado el 15.02.2015]. Fermentación pos cosecha cacao.

16. Disponible en:

https://www.google.com.sv/search?q=cacao+forastero+fotos&biw=1280&bih=629&source=lnms&tbm=isch&sa=X&ei=WN6GVeLxMIPIsATc1qioAg&ved=0CAYQ_AUoAQ&dpr=1#imgsrc=8S5JTmuKJ4b1bM%253A%3B1VOnlyYZBNAHBhM%3Bhttp%253A%252F%252Flatintrails.com%252Fuploads%252F17%252F39%252F1739d5b8aaad0c9751d22ff2843b3dcf%252Ftours-trinitario-tours.jpg%3Bhttp%253A%252F%252Fwww.latintrails.com%252Fforastero-tour%3B640%3B300 . [Consultado el 02.02.2015]. Fotografía de cacao forastero.

17. Disponible en:

http://www.edualter.org/material/explotacion/unidad5_2.htm. [Consultado el 22.02.2015]. Historia del Cacao.

18. Disponible en:

<http://www.concetucocina.com.ar/historiamitos/hc00276.htm>. [Consultado el 12.12.2014]. Historia del cacao-chocolate.

19. Disponible en:

http://es.wikipedia.org/wiki/Chocolate_caliente. [Consultado 24.02.2015]. Historia del chocolate.

20. Disponible en: http://econegociosagricolas.com/ena/files/INTE_23-02-04-09.pdf. [Consultado el 24.02.2014]. Instituto de Normas Técnicas de Costa Rica. 1ª edición. Costa Rica. INTECO 2009; 1-10.

21. Disponible en: <http://www.sag.cl/sites/default/files/it-lab-15-v02.pdf>. [Consultado el 22.02.2014]. Instructivo técnico para recuento de

microorganismos aerobios mesófilos mediante método tradicional de cultivo AOAC Método Oficial 966.23.C.

22. Disponible en:

<http://www.ifrj.upm.edu.my/19%20%2801%29%202011/%2817%29IFRJ-2011-150.pdf>. [Consultado el 23.10.2013]. International food research journal. (2012); 19(1): 127-133.

23. Disponible en:

<http://www.electronic-systems.com.mx/pdf/AGAR%20DEXTROSA%20Y%20PAPA.pdf>. [Consultado el 10.11.2013]. MCD LAB. Agar Dextrosa y Papa.

24. Disponible en: http://www.mastgrp.com/IFUS/IFU402_SPA.pdf (30). [Consultado el 10.11.2013]. M.R.S Agar DM613. Para el aislamiento, cultivo y enumeración de lactobacilos y otras Bacterias ácido lácticas de alimentos y otros Materiales.

25. Disponible en:

http://www.google.es/#sclient=psyab&q=codex+alimentarius+cacao&oq=codex+alimentarius+cacao&gs_l=hp.3.1328.5099.3.11468.6.6.0.0.0.0.377.1384.0j2j3j1.6.0.0.0.1c.1.17.psyab.i5Sjs_DNbu4&pbx=1&bav=on.2,or.r_qf.&bvm=bv.47883778,d.eWU&fp=332924209c0c7106&biw=1280&bih=895⁹. [Consultado el 12.05.2013]. Normas para el chocolate y los productos del chocolate, CODEX STAN 87 1981.

26. Disponible en: http://www.mastgrp.com/IFUS/IFU402_SPA.pdf. [Consultado el 20.05.2014]. Para el aislamiento, cultivo y enumeración de

lactobacilos y otras bacterias ácido lácticas de alimentos otros materiales.
MRS Agar.

27. Disponible en:

http://www.frro.utn.edu.ar/repositorio/catedras/quimica/5_anio/bioteecnologia/practico4.pdf. [Consultado el 23.11.2013]. Práctico N° 4, Tinción y Observación de Microorganismos. 2009. Universidad Tecnológica Nacional. Facultad Regional Rosario. Departamento de Ingeniería Química. Cátedra de Biotecnología.

28. Disponible en: <http://elmundo.com.sv/planean-alza-en-area-cultivada-con-cacao>. Planean alza en área cultivada con cacao. Diario El Mundo. Jueves 3 de enero de 2013. Redacción Economía.

29. Disponible en:

https://www.bd.com/europe/regulatory/Assets/IFU/Difco_BBL/254483.pdf. [Consultado el 23.11.2013]. Plate count agar. Difco™ & BBL™ Manual 2nd edition.

30. Disponible en:

http://www.ispch.cl/lab_amb/doc/microbiologia_alimentos/PRT-031.pdf
Procedimiento recuento mohos y levaduras en alimentos norma ISO 7954. Sección microbiología de alimentos. Revisión 2008.

31. Disponible en:

<http://iicaelsalvador.com/index.php?id=446>. [Consultado el 25.02.2014]. Reactivación comercial, medioambiental y cultural, Boletín informativo del IICA oficina El Salvador, 12 octubre 2012.

32. Disponible en:

<http://www.fundesyam.info/biblioteca/displayFicha.php?fichaID=3822>

[Consultado el 08.07.2014]. Tecnología: Cacao fermentación del grano.

Código: 900334 Sección: Manejo Agroecológico de Cacao. Fecha

registro: 09 de Febrero de 2014 a las 5:36:14 PM | Ult. Actualización: 09

de Febrero de 2014.

33. Disponible en:

http://www.unac.edu.pe/documentos/organizacion/vri/cdcitra/Informes_Finales_Investigacion/IF_JUNIO_2012/IF_CALDERON%20OTOYA_FCA/capitulo%206%20y%207.pdf. Desviación estándar. Capítulo 6. [Consultado el 24.08.2014]. Universidad Nacional del Callao. Facultad de Ciencias Administrativas.

34. Disponible en: <http://www.ojocientifico.com/2010/12/17/%C2%BFque-son-las-bacterias-aerobias>. [consultado el 10.06.2014]. Bacterias Aerobias.

35. Emmanuel O. A., Jennifer Q, Agnes S. B., Jemmy S. T. and Firibu K. S. Influence of pulp-preconditioning and fermentation on fermentative quality and appearance of ghanaiian cocoa (*Theobroma cacao* L.) beans. Disponible en:

<http://www.ifrj.upm.edu.my/19%20%2801%29%202011/%2817%29IFRJ-2011-150.pdf>

36. Fariñez. Del Grano de Cacao al Chocolate. 2008. Disponible en:

<http://www.farinez.com/labels/moldeado.html>

37. García A, Urrieta Saltijeral; Morales Cruz; García Alvarado. Perfiles de concentración interna de acidez volátil a través de la fermentación de cacao. [consultado 18 de marzo de 2013]; 1-3. Disponible en: <http://promepca.sep.gob.mx/archivospdf/produccion/Producto834154.pdf>
38. Garcia Alamilla P. Caracterización microbiana, bioquímica y cinética del proceso de fermentación durante el Beneficio de cacao. México, D.F Diciembre 2000. Departamento de Ingeniería de Procesos e Hidráulica Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa.n Disponible en: file:///C:/Documents%20and%20Settings/Administrador/Mis%20documentos/Downloads/re-11_2000_maestria_pedro_garcia_allamilla_9066_.pdf
39. Gil Quintero J. Estabilidad y actividad antioxidante de catequinas presentes en cacaos colombianos durante los procesos de preindustrialización. Medellín 2012. Universidad de Antioquía. Facultad de Química Farmacéutica, Disponible en: <http://tesis.udea.edu.co/dspace/bitstream/10495/1621/1/TESIS%20Jorge%20Andres%20Gil%20FINAL.pdf>
40. Graziani de Fariñas L, Ortiz de Bertorelli L, Rovedas G. Influencia de varios factores sobre características del grano de cacao fermentado y secado al sol. Agronomía Trop. [revista en línea] 2009. [Consultado 20 de enero de 2013]; 59(2): 119-127. Disponible en: http://sian.inia.gob.ve/repositorio/revistas_ci/Agronomia%20Tropical/at5902/pdf/ortiz_l.pdf
41. Guillamón J. Desarrollo de técnicas moleculares para la identificación de bacterias acéticas.

Disponible

en:<http://www.fe.urv.cat/media/upload/axius/winegar/guillamon.pdf>

42. Kiste F. Implementarán mejoras en variedad de cacao aromático. Diario El Mundo. Miércoles 16 de enero de 2013. Disponible en:
<http://elmundo.com.sv/implementaran-mejoras-en-variedad-de-cacao-aromatico>.
43. Lambert, Mars, Smilja Inc. Traducción original. Fermentación del cacao aspectos generales. Disponible en: http://www.ruta.org/CDOC-Deployment/documentos/19_Fermentacion_del_Cacao.pdf
44. Liendo RJ. Procesamiento del cacao para la fabricación de chocolate y sus subproductos. Investigador. INIA. Centro Nacional de Investigaciones Agrícolas. Maracay, estado Aragua. Disponible en:
http://www.ruta.org/CDOC-Deployment/documentos/El_Chocolate.pdf.
45. Manacorda A.M., Cuadros D.P y Álvarez A.S. Manual práctico de microbiología, Tomo I, Microbiología ambiental I, 2007. Capítulo 8 Recuento de microorganismos. Disponible en:
<http://www.faciasuncoma.com.ar/Carreras/Saneamiento%20Ambiental/MicrobiologiaAmbiental/8%20RECUESTO.pdf>
46. Montesinos EC. Caracterización de la cadena de valor de cacao en El Salvador. Ministerio de agricultura y ganadería, septiembre 2012. Disponible en:
http://www.iica.int/Esp/regiones/central/salvador/Documents/Documentos%20PAF/caracterizacion_cadena_cacao.pdf

47. Morazán Chávez, Al. Evaluación de las características Microultraestructurales para el control de calidad de la fermentación de ocho genotipos diferentes de semillas fermentada de *Theobroma cacao* L. Universidad de El Salvador, Julio 2012.
48. Navarrete G. Cacao, Ficha de Mercado N° 8, mayo 2011, disponible en:
<http://www.mag.gob.com.sv>
49. Rivera Fernández RD; Mecías Gallo FW, Guzmán Cedeño A, Peña Galeas M, Medina Qinteros HN, Casanova Ferrín LM, et al. Efecto del Tipo Y Tiempo de Fermentación en la Calidad Física y Química del Cacao (*Theobroma cacao* L.) Tipo Nacional. 2012; 5(1): 7-12. [Consultado el 16 de febrero de 2013]. Disponible en:
http://www.uteq.edu.ec/revistacyt/publico/archivos/C2_calidad%20fisica%20quimica%20cacao.pdf
50. Rojas Ardila J. Tipos de fermentación de cacao según requerimientos del mercado. 2010. Disponible en:
<http://www.finagro.com.co/html/cache/HTML/SIS/Cacao/congreso/Miercoles.tipos%20de%20fermentaciOn%20de%20cacao%20segUn%20requerimientos%20del%20mercado.pdf>.
51. Saltini R, Akkerman R, Frosch S. Optimizing chocolate Production through traceability: A review of the influence of farming practices on cocoa bean quality, Agosto 2012. Disponible en:
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0956713512002885>
52. Sánchez Campuzano VA. Caracterización organoléptica del cacao (*Theobroma cacao* L.), para la selección de árboles con perfiles de

sabor de interés comercial. Quevedo Las Ríos Ecuador 2007.

Universidad técnica estatal de quevedo facultad de ciencias agrarias
escuela de ingeniería agronómica. Disponible en:

http://www.fec-chiapas.com.mx/sistema/biblioteca_digital/caracterizacion-organoleptica-cacao--theobroma-cacao-l.-seleccion-arboles--perfiles-sabor-interes-comercial.pdf

53. Santacruz Cifuentes LA. Análisis químico de antocianinas en frutos silvestres colombianos. Bogotá D.C., Mayo 20 de 2011. Universidad nacional de Colombia facultad de ciencias departamento de química. Código 197518. Tesis de Maestría en Ciencias Química. Disponible en:
<http://www.bdigital.unal.edu.co/5351/1/197518.2011.pdf>

54. Secretaria de agricultura de Antioquia, compañía nacional de chocolates S.A. Corporación de para investigaciones biológicas (CIB). Grupo GIEM universidad de Antioquia. Manual de beneficio del cacao. 2008. Disponible en:
http://www.fec-chiapas.com.mx/sistema/biblioteca_digital/manual-beneficio-cacao.pdf

55. Tobar G. Buscan reactivar el cultivo del cacao en el país. Diario El Mundo. Domingo 8 de julio 2012. Disponible en:
<http://elmundo.com.sv/buscan-reactivar-el-cultivo-del-cacao-en-el-país>

GLOSARIO (5) (9) (24) (47)

Accesión

Se utiliza como termino para designa el material genético que fue introducido y sembrado en el germoplasma.

Catador

Persona que se dedica a probar o catar un alimento para informar de su calidad y des sus propiedades.

Cotiledón

Son las hojas primordiales que se encuentran en el germen de la semilla.

Fenotipo

Es cualquier característica o rasgo observable en el cacao.

Fermentación de cacao

Es una etapa del beneficio del cacao posterior al desgrane, clave para el desarrollo de las principales propiedades sensoriales de la semilla de cacao.

Germoplasma

Conjunto de genes que se transmite por la reproducción a la descendencia por medio de los gametos o células reproductoras.

Índice de Fermentación

Relación de la absorbancia de 460nm entre la absorbancia de 530nm.

Microorganismos (Mos)

También llamado microbio u organismo microscópico, es un ser vivo que solo puede visualizarse con el microscópio.

***Theobroma Cacao* L. (cacao)**

Es el nombre científico que recibe el árbol de cacao.

μm

El micrómetro o micra es una unidad de longitud, equivalente a una millonésima parte de un metro.

ANEXOS

ANEXO N° 1

Origen de las importaciones de cacao

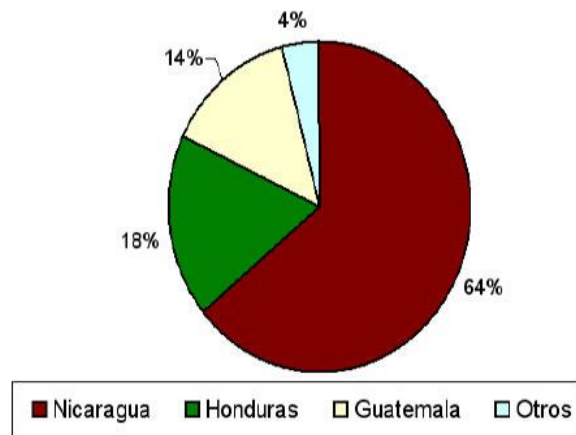


Figura N° 31. Porcentajes de cacao que importan países Centroamericanos a El Salvador. (12) (13)

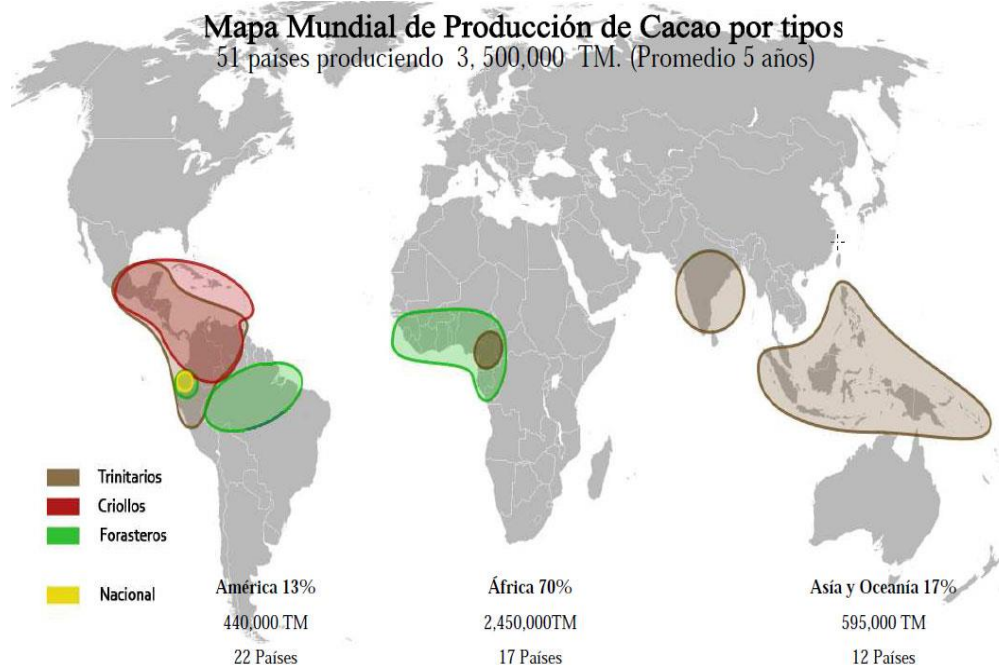


Figura N° 32. Mapa mundial de producción de cacao por tipos. (12) (13)

ANEXO N°2

Proceso general de fermentación de mezclas de semillas de cacao.

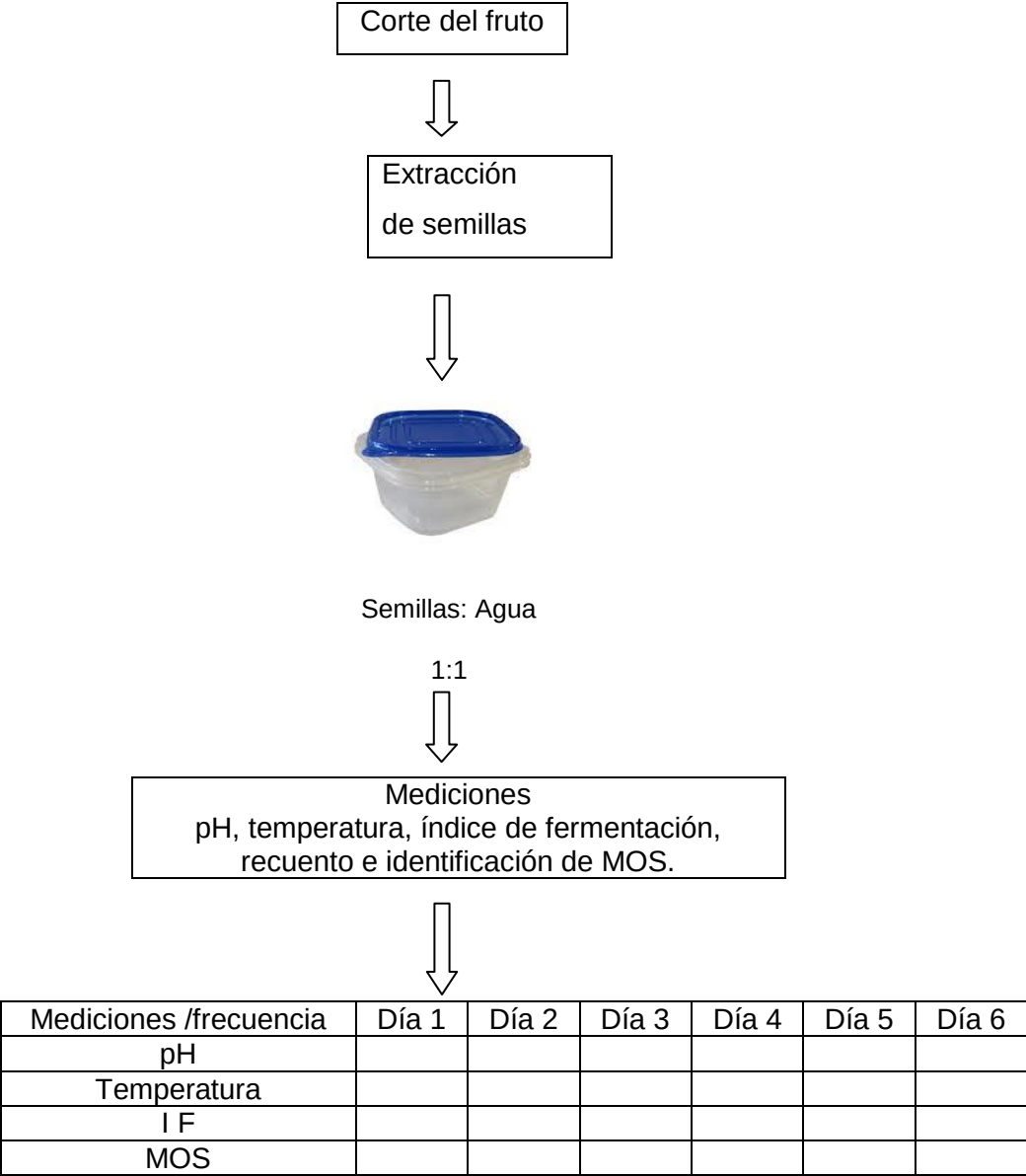
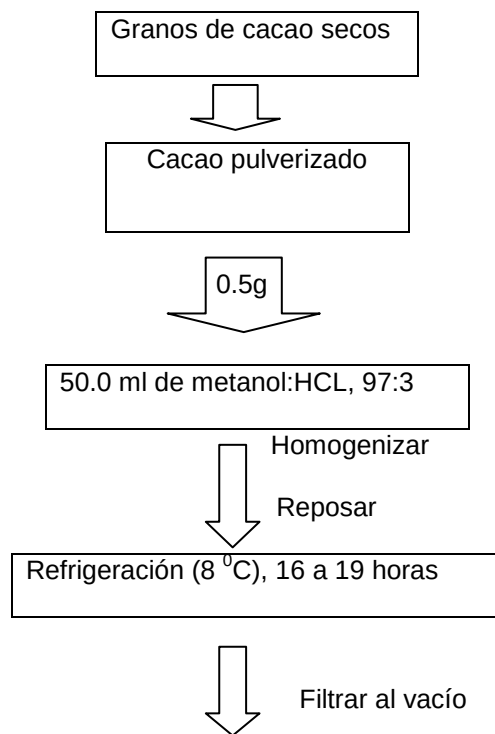


Figura N° 33. Esquema del proceso de fermentación de semillas de cacao

Cabe mencionar que en algunos ensayos, el proceso de fermentación varió, en algunos se analizó solo un tipo de cacao y en otras mezclas de tipos de cacao. En algunos ensayos se controlaron temperatura y pH.

ANEXO N° 3

Determinación del índice de fermentación en mezclas de semillas de cacao (IF)



Llevar a volumen 50.0 mL



Leer espectrofotómetro

460 nm y 530 nm.

Figura N° 34 Esquema para la determinación de índice de fermentación

ANEXO N° 4

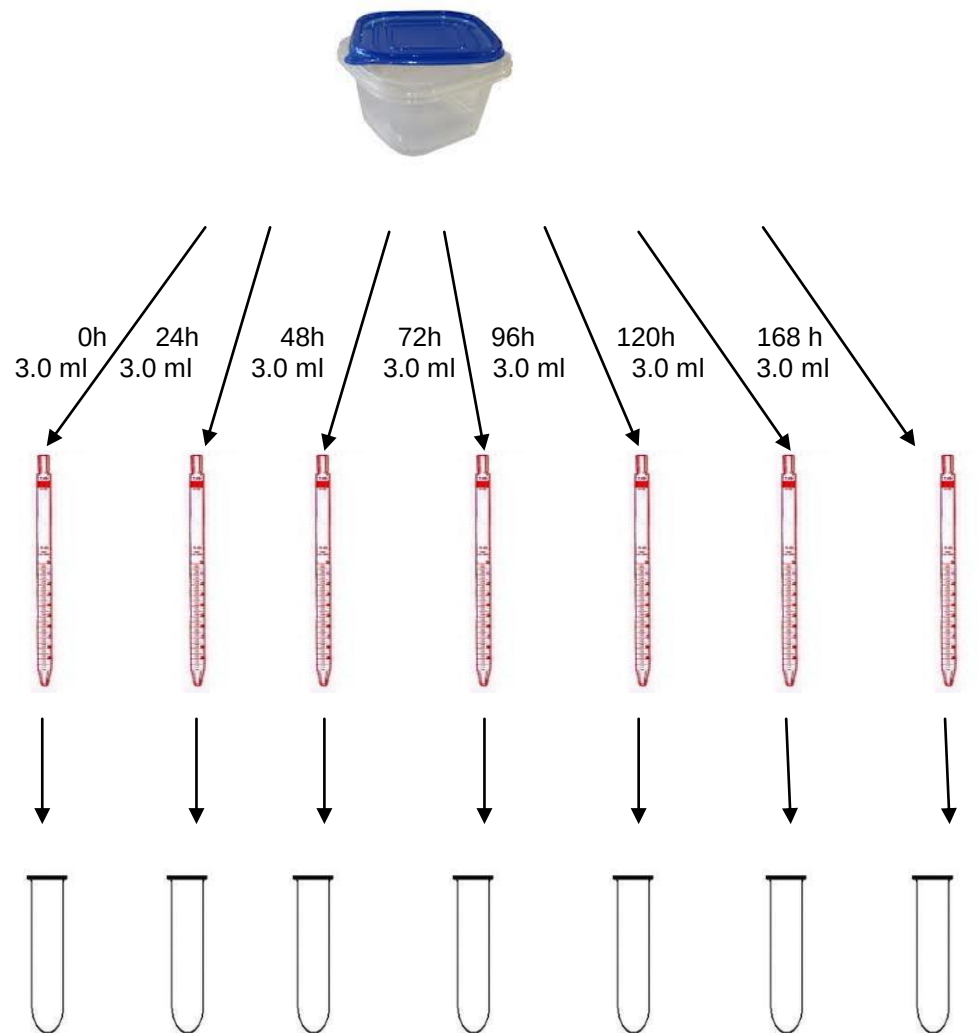
Tabla N° 17. Lecturas obtenidas de temperatura y pH, tomadas a la mezcla que contiene el recipiente fermentador.

DIA	TEMPERATURA	pH
1		
2		
3		
4		
5		
6		

ANEXO N° 5

Esquema de recolección de mezclas fermentadas.

MX. Semillas de cacao: Agua 1:1



Cada Tubo contiene 5ml de CCC más glicerol 5%.

Figura N° 35. Esquema de recolección de mezclas fermentadas

Anexo N° 6

Recuento de microorganismos

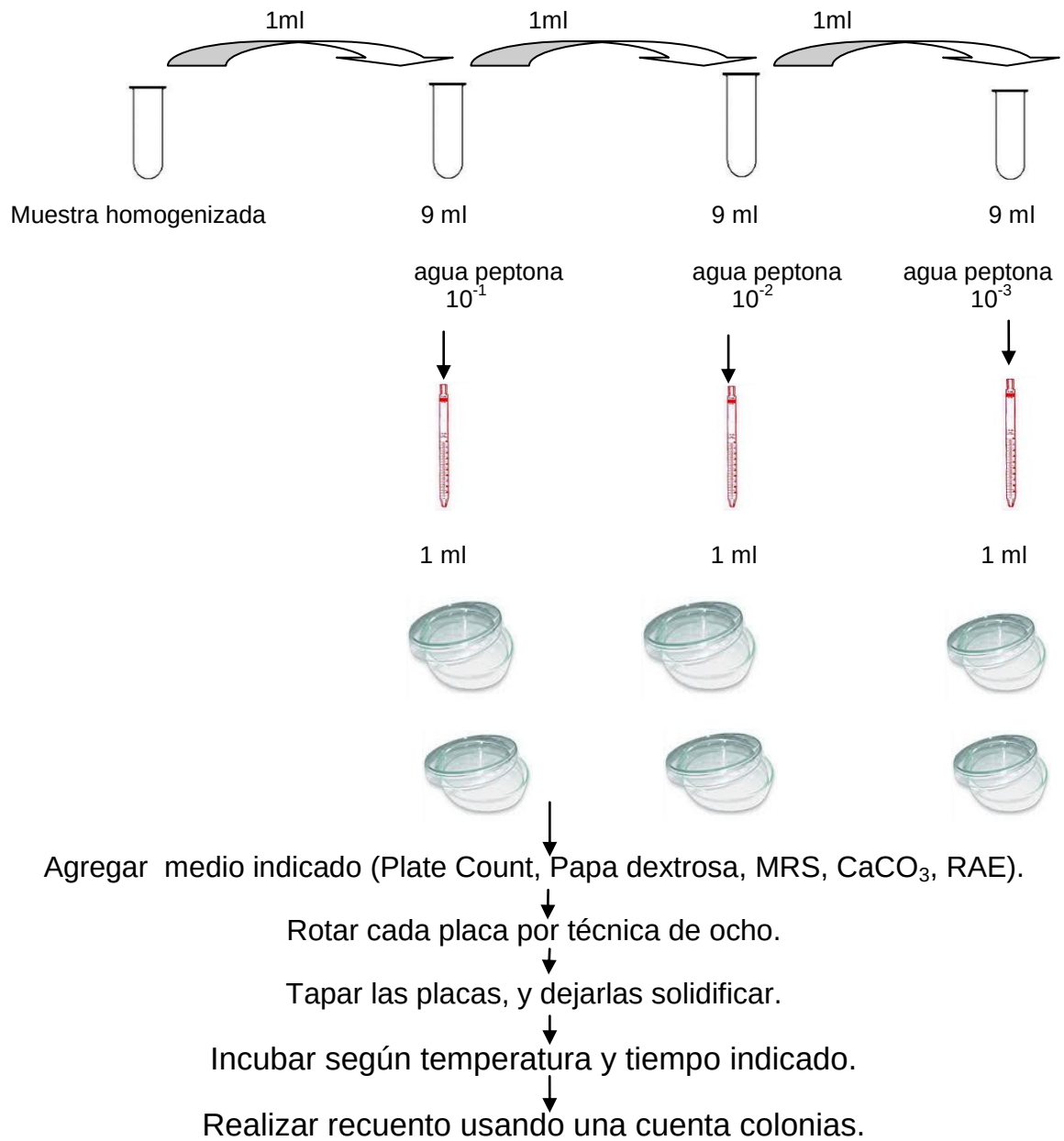


Figura N° 36. Esquema para la preparación de diluciones decimales de cada mezcla recolectada.

ANEXO N° 7

Medios y Reactivos Utilizados para la Identificación de Bacterias Fermentadoras.

Agar Plate Count.

Utilizado para cuantificar bacterias aerobias.

Preparación de medio de cultivo: Disolver 23.5g de medio en 1L de agua destilada, calentar hasta disolver, esterilizar a 121°C por 15 minutos.

Agar Papa Dextrosa.

Utilizado para cuantificar hongos y levaduras.

Preparación de medio de cultivo: Disolver 39g de medio en 1L de agua destilada, calentar hasta disolver, esterilizar a 121°C por 15 minutos.

Agar M.R.S. bacterias lácticas.

El Agar M.R.S. fue desarrollado por Man, Rogosa y Sharpe para proveer un medio que pudiera evidenciar un buen crecimiento de lactobacilos y otras bacterias ácido láctico.

Cuadro N° 30 Preparación de agar M.R.S. para identificar bacterias lácticas.

Fórmula (en gramos por litro)		Instrucciones
Proteosa peptona N° 3	10.0	Suspender 64 g del medio en un litro de agua destilada. Reposar 5 minutos y mezclar calentando a ebullición durante 1 ó 2 minutos. Esterilizar en autoclave durante 15 minutos a 121 °C.
Extracto de carne	8.0	
Extracto de levadura	4.0	
Glucosa	20.0	
Monoleato de sorbitán	1 ml	
Fosfato dipotásico	2.0	
Acetato de sodio	5.0	
Citrato de amonio	2.0	
Sulfato de magnesio	0.2	
Sulfato de manganeso	0.05	
Agar	13.0	
pH final: 6.4 ± 0.2		

Agar RAE y carbonato de calcio para bacterias acéticas.

El medio de cultivo RAE esta reforzado con acido acético y etanol para simular así el hábitat de las bacterias acéticas. El medio carbonato sirve como identificación de bacterias acéticas; formando un halo transparente alrededor de cada colonia de bacterias.

Cuadro N° 31. Preparación de agar RAE y CaCO₃, para identificar bacterias acéticas.

Medio RAE			Medio CaCO₃	
Glucosa	40	g	Glucosa	10g
Extracto de levadura	10	g	Extracto de levadura	5g
Peptona	10	g	Carbonato de calcio	5g
Fosfato sódico	3.38	g	Agar agar	15g
Acido cítrico	1.5	g	Agua destilada	1L
Etanol	20	ml		
Acido acético	10	ml		
Agar	10	g		
Agua destilada	1	L		

Cuadro N° 32 Preparación de reactivos utilizados en tinción de gram

Cristal violeta y oxalato de amonio (reactivo de Hucker)	Solución A -Cristal violeta (pureza por lo menos 90%) - Etanol 95%	2 g 20 mL
	Solución B -Oxalato de amonio -Agua destilada	0.8 g 80 mL
Lugol	-Yodo	1 g
	-Yoduro de potasio	2 g
	-Agua destilada	300 mL
Alcohol acetona	-Alcohol etílico (95%)	500 mL
	-Acetona	300 mL
Safranina	-Safranina (90%)	0.25 g
	-Etanol (95%)	10 mL
	-Agua destilada	1000 mL

Anexo N° 8

Cuadro N° 33. Mezclas en Fermentación de Ensayo 1 y 2.

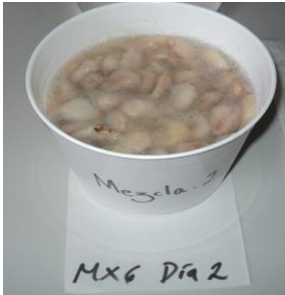
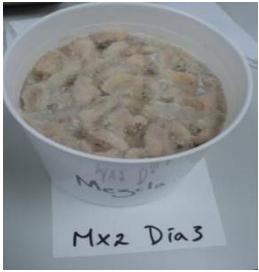
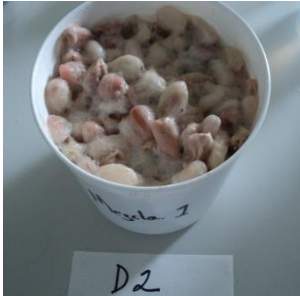
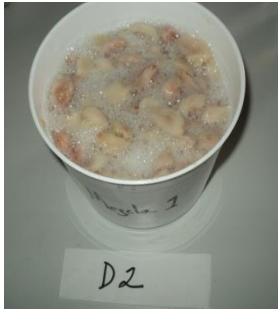
Ensayo 1		
Ensayo 2		

Figura N° 59. Fotografías de mezclas de semillas de cacao durante el proceso de fermentación

ANEXO N° 9

LISTADO DE MATERIAL, EQUIPO Y REACTIVOS.

PROCESO DE FERMENTACIÓN.

Material y equipo.

- Cuchillo grande.
- Pliegos de papel filtro.
- Recipientes plásticos con tapaderas.
- Bolsas plásticas de cuatro libras.
- Vasos de precipitados.
- Probetas.
- Agitador de vidrio.
- Mantel grande.
- Balanza semianalítica.
- Baño maría.

Reactivos.

- Agua destilada.

DETERMINACIÓN DE TEMPERATURA Y pH.

Material y equipo.

- pHmetro con termómetro.

Reactivos.

- Buffer pH 7.
- Buffer pH 4.
- Agua destilada.
- Solución de hidróxido de sodio 3N.

RECOLECCIÓN DE MEZCLAS DE FERMENTACIÓN.

Material y equipo.

- Jeringas de 5mL.
- Tubos de ensayo con rosca.

Reactivos.

- Caldo cerebro corazón con glicerol al 5%.

RECuento DE MICROORGANISMOS.**Material y equipo.**

- Tubos de ensayo.
- Puntas para pipeteador digital.
- Pipeteador digital.
- Gradillas.
- Papel toalla.
- Placas de petri.
- Incubadora.
- Incubadora de anaerobiosis.
- Sobres de anaerobiosis.
- Cuenta colonias.

Reactivos.

- Agua peptonada.
- Agar plate count.
- Agar papa dextrosa.

- Agar MRS.
- Agar RAE.
- Agar CaCO_3 .

Tinción al gram.

Material y equipo.

- Portaobjetos.
- Cubreobjetos.
- Asa bacteriológica.
- Mechero bunsen.
- Cerillos.
- Microscopio electrónico.

Reactivos.

- Solución salina.
- Colorante cristal violeta.
- Lugol.
- Safranina.
- Agua destilada.

Determinación de índice de fermentación.

Material y equipo.

- Estufa.
- Mortero y pistilo.
- Balanza analítica.
- Cámara de extracción de gases.

- Refrigeradora.
- Papel filtro.
- Frascos volumétricos.
- Vasos de precipitados.
- Agitador de vidrio.
- Espectrofotómetro.

Reactivos.

- Metanol-HCl (97:3).

Anexo N° 10

Ubicación del cultivar San José de la Carrera en Usulután.

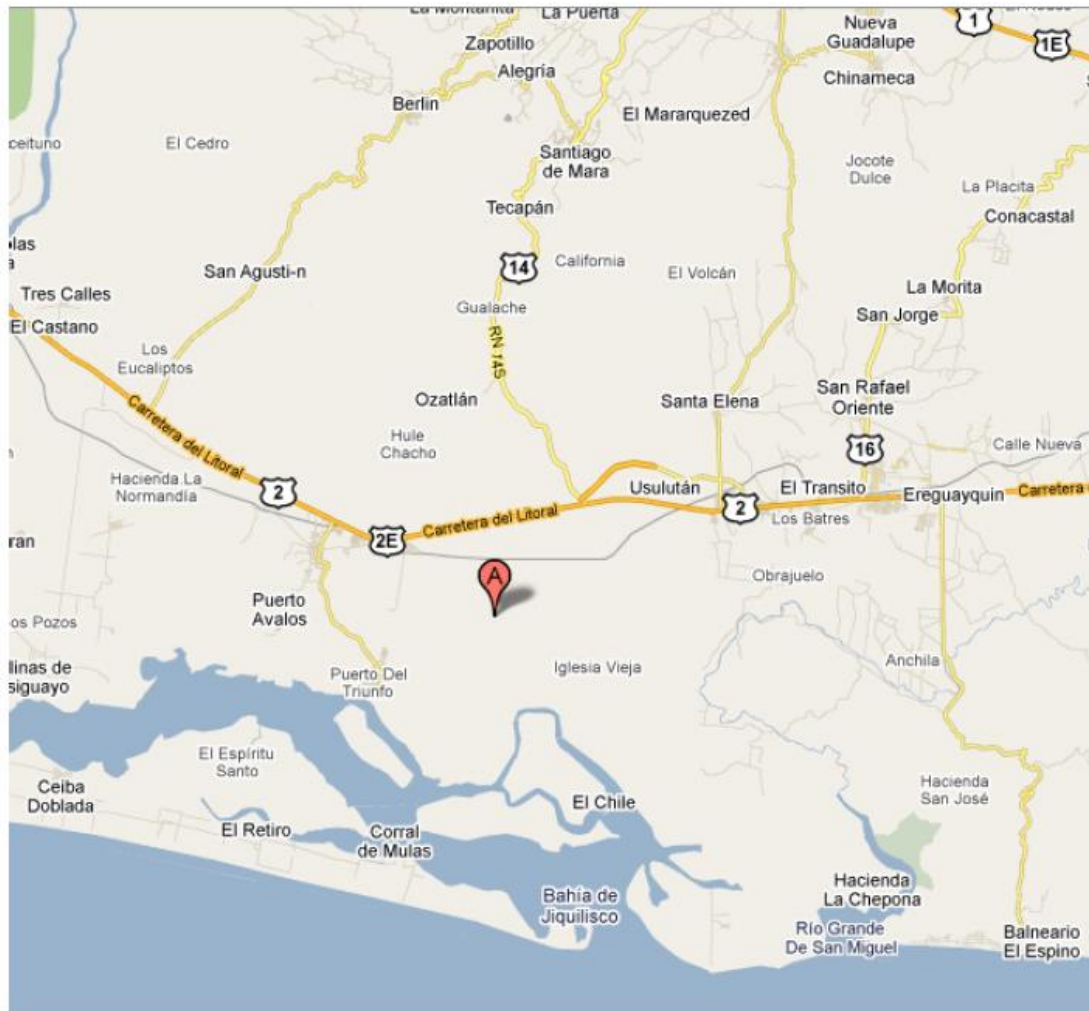


Figura N° 37. Mapa que muestra la ubicación, del Cultivar San José del Real de La Carrera, departamento de Usulután, marcada por la letra "A".

Anexo N° 11

Ejemplo para el cálculo del porcentaje, por tipo de cacao, utilizados en cada mezcla.

Por ejemplo el porcentaje de la mezcla 1 se determinó de la siguiente manera:

Cacao criollo (g)	Cacao trinitario (g)	Cacao forastero (g)
E1 = 120,374	B2 = 91,760	D7 = 131,632
B3 = 118,110		
A4 = 100,948		
C5 = <u>87,670</u>		
427,102		

Total de los 3 tipos de cacao

$$427,102(\text{criollo}) + 91,760(\text{trinitario}) + 131,632(\text{forastero}) = 650,494$$

Porcentaje para cacao criollo

$$650,494 \text{ ----- } 100\%$$

$$427,102 \text{ ----- } X$$

$$X = 65,66 \%$$

De la misma forma se obtuvo para cacao trinitario (14,11%) y forastero (20,24%).

Tabla N° 18 Porcentajes en peso de tipo de cacao en cada mezcla del ensayo 1

Mezcla 1			Mezcla 4		
Tipo de cacao	Peso (g)	%	Tipo de cacao	Peso (g)	%
Criollo	427,102	65,66	Criollo	341,008	47,66
Trinitario	91,760	14,11	Trinitario	374,562	52,34
Forastero	131,632	20,24	Forastero	0	0,00
Total	650,494	100,00	Total	715,57	100,00
Mezcla 2			Mezcla 5		
Tipo de cacao	Peso (g)	%	Tipo de cacao	Peso (g)	%
Criollo	313,282	44,72	Criollo	352,318	59,00
Trinitario	244,858	34,96	Trinitario	94,076	15,76
Forastero	142,334	20,32	Forastero	150,71	25,24
Total	700,474	100,00	Total	597,104	100,00
Mezcla 3			Mezcla 6		
Tipo de cacao	Peso (g)	%	Tipo de cacao	Peso (g)	%
Criollo	694,736	86,99	Criollo	450,9248	68,63
Trinitario	0	0,00	Trinitario	89,44	13,61
Forastero	103,88	13,01	Forastero	116,658	17,76
Total	798,616	100,00	Total	657,0228	100,00

ANEXO N° 12

TABLAS DE RESULTADOS DE ENSAYO N° 1

Tabla 19. Número y peso de semillas en mezclas ensayo 1

MEZCLA	FRUTO	NÚMERO DE SEMILLAS	PESO TOTAL DE SEMILLAS (g)	PESO PROMEDIO DE SEMILLA
Mezcla 1 Cacao criollo	A1	48	182,926	3.811
	B1	45	173,186	3.849
	C1	45	183,782	4.084
	D1	42	148,822	3.543
	E1	44	120,374	2.736
	F1	42	169,512	4.036
	Total		978,602	3.676
Mezcla 2 Cacao tinitario	A2	44	94,076	2.138
	B2	40	91,760	2.294
	C2	36	127,716	3.548
	D2	36	99,504	2.764
	E2	33	97,766	2.963
	Total		510,822	2.741
Mezcla 3 Cacao criollo	A3	41	138,528	3.378
	B3	33	118,110	3.579
	C3	46	168,536	3.664
	D3	47	185,646	3.949
	Total		610,820	3.643
Mezcla 4 Cacao criollo	A4	41	100,948	2.462
	B4	46	158,082	3.437
	C4	49	166,392	3.396
	D4	46	145,675	3.167
	Total		571,097	3.116
Mezcla 5 Cacao criollo	A5	54	166,722	3.087
	B5	49	164,460	3.356
	C5	37	87,670	2.369
	Total		418,852	2.937
Mezcla 6 Cacao trinitario	A6	46	177,292	3.854
	B6	36	89,440	2.484
	C6	40	117,142	2.929
	Total		383,874	3.089
Mezcla 7 Cacao forastero	A7	27	103,880	3.847
	B7	35	116,658	3.333
	C7	46	142,334	3.094

	D7	41	131,632	3.211
	E7	36	150,710	4.186
	Total		645,214	3.534

Tabla N° 20. Temperaturas obtenidas de las mezclas en ensayo 1.

Temperaturas °C						
	Día 0	Día 1	Día 2	Día 3	Día 4	Día 5
Mezcla 1	27,80	28,30	28,30	28,00	27,70	27,80
	27,90	28,10	28,30	28,20	27,50	27,90
	28,20	28,50	28,40	28,20	27,80	27,90
Promedio	27,97	28,30	28,33	28,13	27,67	27,87
Mezcla 2	28,00	28,50	28,00	27,10	27,70	28,00
	28,10	28,50	28,50	28,00	27,90	28,10
	28,10	28,50	28,50	28,10	27,90	28,10
Promedio	28,07	28,50	28,33	27,73	27,83	28,07
Mezcla 3	28,10	28,10	28,00	27,50	27,40	27,80
	28,10	28,40	28,40	28,20	27,70	27,90
	28,20	28,50	28,40	28,30	27,80	27,90
Promedio	28,13	28,33	28,27	28,00	27,63	27,87
Mezcla 4	28,00	27,80	28,20	27,70	27,40	27,80
	28,20	28,40	28,50	28,20	27,60	28,00
	28,10	28,50	28,50	28,30	27,60	28,00
Promedio	28,10	28,23	28,40	28,07	27,53	27,93
Mezcla 5	28,00	27,80	28,20	27,20	27,50	27,70
	28,20	28,40	28,50	28,20	27,80	27,90
	28,20	28,50	28,50	28,30	27,80	28,00
Promedio	28,13	28,23	28,40	27,90	27,70	27,87
mezcla 6	27,80	28,20	28,20	27,80	27,40	27,80
	28,00	28,50	28,40	28,10	27,70	28,00
	27,80	28,40	28,40	28,10	27,70	28,10
Promedio	27,87	28,37	28,33	28,00	27,60	27,97

Tabla N° 21. pH obtenido de las mezclas en fermentación ensayo 1

pH						
	Día 0	Día 1	Día 2	Día 3	Día 4	Día 5
Mezcla 1	4,12	4,05	3,74	3,61	3,73	3,87
	4,08	4,05	3,70	3,62	3,78	3,89
	4,10	4,06	3,71	3,62	3,77	3,89
Promedio	4,10	4,05	3,72	3,62	3,76	3,88
Mezcla 2	4,26	4,20	3,84	3,66	3,68	3,65
	4,30	4,19	3,86	3,67	3,68	3,64
	4,33	4,19	3,84	3,69	3,68	3,63
Promedio	4,30	4,19	3,85	3,67	3,68	3,64
Mezcla 3	4,29	4,33	3,97	3,66	3,68	3,68
	4,30	4,28	3,99	3,66	3,68	3,69
	4,31	4,29	3,99	3,66	3,67	3,67
Promedio	4,30	4,30	3,98	3,66	3,68	3,68
Mezcla 4	4,01	4,07	3,66	3,57	3,58	3,58
	3,99	4,10	3,64	3,58	3,58	3,58
	3,90	4,08	3,67	3,58	3,56	3,58
Promedio	3,97	4,08	3,66	3,58	3,57	3,58
Mezcla 5	4,19	4,07	3,66	3,57	3,55	3,68
	4,12	4,10	3,64	3,58	3,54	3,64
	4,20	4,08	3,67	3,58	3,54	3,63
Promedio	4,17	4,08	3,66	3,58	3,54	3,65
mezcla 6	4,03	4,17	3,92	3,67	3,66	3,62
	4,06	4,17	3,95	3,68	3,65	3,62
	4,07	4,14	3,94	3,66	3,65	3,61
Promedio	4,05	4,16	3,94	3,67	3,65	3,62

Tabla N° 22. Lecturas de absorbancias obtenidas en las mezclas para índice de fermentación a 460 nm ensayo 1

Lecturas a 460 nm (absorbancia)						
	Día 0	Día 1	Día 2	Día 3	Día 4	Día 5
Mezcla 1	0,077	0,110	0,149	0,289	0,293	0,166
	0,077	0,108	0,144	0,290	0,287	0,167
	0,079	0,114	0,148	0,287	0,288	0,169
Mezcla 2	0,178	0,145	0,175	0,269	0,333	0,296
	0,174	0,145	0,181	0,261	0,327	0,297
	0,178	0,145	0,140	0,262	0,333	0,298
Mezcla 3	0,169	0,135	0,146	0,238	0,219	0,226
	0,167	0,134	0,143	0,227	0,220	0,221
	0,176	0,133	0,142	0,227	0,222	0,225
Mezcla 4	0,109	0,163	0,341	0,364	0,346	0,340
	0,099	0,172	0,341	0,355	0,346	0,341
	0,098	0,172	0,344	0,358	0,350	0,355
Mezcla 5	0,153	0,119	0,316	0,268	0,350	0,329
	0,153	0,117	0,316	0,265	0,345	0,325
	0,157	0,115	0,316	0,265	0,344	0,323
Mezcla 6	0,288	0,105	0,259	0,309	0,397	0,180
	0,284	0,106	0,257	0,316	0,400	0,181
	0,289	0,108	0,260	0,311	0,396	0,181

Tabla N° 23. Lecturas obtenidas de las mezclas para índice de fermentación a 530 nm ensayo 1

Lecturas a 530 nm (absorbancia)						
	Día 0	Día 1	Día 2	Día 3	Día 4	Día 5
Mezcla 1	0,068	0,139	0,176	0,399	0,490	0,103
	0,068	0,165	0,180	0,405	0,507	0,110
	0,067	0,158	0,179	0,405	0,516	0,108
Mezcla 2	0,322	0,286	0,132	0,390	0,584	0,226
	0,319	0,285	0,143	0,383	0,586	0,217
	0,324	0,282	0,138	0,375	0,597	0,215
Mezcla 3	0,212	0,193	0,216	0,300	0,339	0,194
	0,216	0,192	0,217	0,300	0,343	0,193
	0,213	0,174	0,214	0,305	0,344	0,193
Mezcla 4	0,140	0,259	0,401	0,682	0,653	0,392
	0,138	0,262	0,399	0,690	0,654	0,398
	0,149	0,256	0,398	0,689	0,654	0,407
Mezcla 5	0,315	0,169	0,349	0,389	0,522	0,215
	0,320	0,173	0,348	0,396	0,528	0,205
	0,320	0,178	0,346	0,397	0,529	0,230
Mezcla 6	0,685	0,146	0,365	0,605	0,775	0,127
	0,693	0,140	0,363	0,605	0,789	0,132
	0,698	0,132	0,361	0,599	0,789	0,125

Tabla N° 24. Relación de la absorbancia a 460nm entre la absorbancia a 530nm, de las mezclas para índice de fermentación ensayo 1

	Día 0	Día 1	Día 2	Día 3	Día 4	Día 5
Mezcla 1	1,132	0,791	0,847	0,724	0,598	1,612
	1,132	0,655	0,800	0,716	0,566	1,518
	1,179	0,722	0,827	0,709	0,558	1,565
Promedio	1,148	0,722	0,824	0,716	0,574	1,565
Mezcla 2	0,553	0,507	1,326	0,690	0,570	1,310
	0,545	0,509	1,266	0,681	0,558	1,369
	0,549	0,514	1,014	0,699	0,558	1,386
Promedio	0,549	0,510	1,202	0,690	0,562	1,355
Mezcla 3	0,797	0,699	0,676	0,793	0,646	1,165
	0,773	0,698	0,659	0,757	0,641	1,145
	0,826	0,764	0,664	0,744	0,645	1,166
Promedio	0,799	0,721	0,666	0,765	0,644	1,159
Mezcla 4	0,779	0,629	0,850	0,534	0,530	0,867
	0,717	0,656	0,855	0,514	0,529	0,857
	0,658	0,672	0,864	0,520	0,535	0,872
Promedio	0,718	0,653	0,856	0,523	0,531	0,865
Mezcla 5	0,486	0,704	0,905	0,689	0,670	1,530
	0,478	0,676	0,908	0,669	0,653	1,585
	0,491	0,646	0,913	0,668	0,650	1,404
Promedio	0,485	0,676	0,909	0,675	0,658	1,507
Mezcla 6	0,420	0,719	0,710	0,511	0,512	1,417
	0,410	0,757	0,708	0,522	0,507	1,371
	0,414	0,818	0,720	0,519	0,502	1,448
Promedio	0,415	0,765	0,713	0,517	0,507	1,412

Recuentos de microorganismos de las mezcla 1 a la 6 del ensayo 1

Tabla 25. Recuento de microorganismos en la mezcla 1 de fermentación ensayo 1

Mezcla 1						
UFC/mL						
	Día 0	Día 1	Día 2	Día 3	Día 4	Día 5
Bacterias lácticas	1,500	18,000	75,000	380,000	490,000	630,000
Bacterias acéticas	100	100	100	11,000	210,000	370,000
Hongos y levaduras	19,000	5,300	72,000	380,000	140,000	110,000
Bacterias aerobias	100	100	7,600	220,000	220,000	590,000

Tabla 26. Recuento de microorganismos en la mezcla 2 de fermentación ensayo 1

Mezcla 2						
UFC/mL						
	Día 0	Día 1	Día 2	Día 3	Día 4	Día 5
Bacterias lácticas	100	13,000	40,000	370,000	33,000	450,000
Bacterias acéticas	100	2,000	100	9,300	530,000	330,000
Hongos y levaduras	1,300	7,700	90,000	230,000	530,000	136,000
Bacterias aerobias	18,000	2,000	1,000	95,000	380,000	480,000

Tabla 27. Recuento de microorganismos en la mezcla 3 de fermentación ensayo 1

Mezcla 3						
UFC/mL						
	Día 0	Día 1	Día 2	Día 3	Día 4	Día 5
Bacterias lácticas	100	8,500	2,800	400,000	140,000	180,000
Bacterias acéticas	100	100	500	26,000	580,000	500,000
Hongos y levaduras	4,300	800	6,400	240,000	410,000	320,000
Bacterias aerobias	49,000	100	1,000	130,000	140,000	130,000

Tabla 28. Recuento de microorganismos en la mezcla 4 de fermentación ensayo 1

Mezcla 4						
UFC/mL						
	Día 0	Día 1	Día 2	Día 3	Día 4	Día 5
Bacterias lácticas	100	100	4,700	490,000	120,000	470,000
Bacterias acéticas	11,000	100	100	30,000	60,000	700,000
Hongos y levaduras	300	650	100,000	270,000	160,000	150,000
Bacterias aerobias	13,000	10,000	82,000	105,000	71,000	30,000

Tabla 29. Recuento de microorganismos en la mezcla 5 de fermentación, ensayo 1

Mezcla 5						
UFC/mL						
	Día 0	Día 1	Día 2	Día 3	Día 4	Día 5
Bacterias lácticas	300	9,000	63,000	290,000	1,000,000	1,600,000
Bacterias acéticas	100	1,300	100	55,000	150,000	1800,000
Hongos y levaduras	6,000	2,200	50,000	190,000	330,000	160,000
Bacterias aerobias	500,000	10,000	100	78,000	140,000	40,000

Tabla 30. Recuento de microorganismos en la mezcla 6 de fermentación ensayo 1

Mezcla 6						
UFC/mL						
	Día 0	Día 1	Día 2	Día 3	Día 4	Día 5
Bacterias lácticas	100	7,800	170,000	710,000	760,000	440,000
Bacterias acéticas	100	3,200	8,000	130,000	400,000	1,100,000
Hongos y levaduras	600	5,000	350,000	270,000	340,000	380,000
Bacterias aerobias	43,000	5,600	57,000	190,000	300,000	120,000

**Recuentos de microorganismos de las mezcla 1 a la 6 del ensayo 1 en
logaritmos**

Tabla 31. Recuento de microorganismos en logaritmos en mezclas ensayo 1

Mezcla 1						
UFC/mL						
	Día 0	Día 1	Día 2	Día 3	Día 4	Día 5
B. lácticas	3,180	3,260	4,880	5,580	5,700	5,800
B. acéticas	2	2	2	4,040	5,320	5,570
Hongos y levaduras	4,280	3,720	4,860	5,580	5,150	5,040
B. aerobias	2	2	3,880	5,340	5,340	5,770
Mezcla 2						
UFC/mL						
	Día 0	Día 1	Día 2	Día 3	Día 4	Día 5
B. lácticas	2	4,110	4,600	5,570	4,520	5,650
B. acéticas	2	3,300	2	3,970	5,720	5,520
Hongos y levaduras	3,110	3,890	4,950	5,360	5,720	5,130
B. aerobias	4,250	3,300	3,000	4,980	5,580	5,680
Mezcla 3						
UFC/mL						
	Día 0	Día 1	Día 2	Día 3	Día 4	Día 5
B. lácticas	2,000	3,930	3,450	5,600	5,150	5,260
B. acéticas	2,000	2,000	5,700	4,410	5,760	5,700
Hongos y levaduras	3,630	5,900	3,810	5,380	5,610	5,510
B. aerobias	4,690	2,000	3,000	5,110	5,150	5,110
Mezcla 4						
UFC/mL						
	Día 0	Día 1	Día 2	Día 3	Día 4	Día 5
B. lácticas	2	2	3,670	5,700	5,080	5,670
B. acéticas	4,040	2	2	4,480	4,780	5,850
Hongos y levaduras	2	3	5,000	5,430	5,200	5,180
B. aerobias	4,110	4,000	4,910	5,020	4,850	4,480
Mezcla 5						
UFC/mL						
	Día 0	Día 1	Día 2	Día 3	Día 4	Día 5
B. lácticas	5,480	3,950	4,800	5,460	6,000	6,200
B. acéticas	2	3,110	2	4,740	5,180	6,260

Hongos y levaduras	3,780	3,340	4,700	5,280	5,520	5,200
B. aerobias	5,700	4,000	2	4,890	5,150	4,600
Mezcla 6						
UFC/mL						
	Día 0	Día 1	Día 2	Día 3	Día 4	Día 5
B. lácticas	2	3,900	5,230	5,850	5,880	5,640
B. acéticas	2	3,510	3,900	5,110	5,600	6,040
Hongos y levaduras	3	3,700	5,540	5,430	5,530	5,580
B. aerobias	4,630	3,750	4,760	5,280	5,480	5,080

ANEXO N° 13

TABLAS DE RESULTADOS DE ENSAYO N° 2

Tabla N° 32. Número y peso de semillas en mezclas del ensayo 2

MUESTRA	FRUTO	SEMILLAS	PESO (g)	Peso por semilla
Mezcla 1 Criollo	B1	33	109,790	3.327
	C1	41	154,634	3.771
	D1	47	116,672	2.482
	E1	35	99,726	2.849
	F1	36	107,000	2.972
	G1	37	135,140	3.652
	Total		772,962	3.176
Mezcla 2 Criollo	A2	34	100,046	2.943
	B2	28	68,374	2.442
	C2	39	100,554	2.578
	E2	37	127,606	3.449
	F2	34	153,334	4.510
	G2	28	82,758	2.956
	Total		632,672	3.146
Mezcla 3 Criollo	A3	39	156,282	4.007
	B3	45	162,292	3.606
	C3	47	158,324	3.369
	D3	35	140,772	4.022
	E3	47	146,256	3.112
	F3	36	98,588	2.739
	Total		862,514	3.475
Mezcla 4 Forastero	A4	47	118,678	2.525
	B4	54	177,966	3.296
	C4	42	164,460	3.916
	D4	39	137,676	3.530
	E4	31	88,574	2.857
	F4	37	166,716	4.506
	G4	36	141,510	3.931
	H4	40	161,190	4.030
	I4	47	196,706	4.186
	Total		1,353,476	3.642
Mezcla 5 Trinitario	A5	35	83,148	2.376
	B5	37	129,389	3.497
	C5	44	114,898	2.611
	D5	46	128,988	2.804
	E5	40	158,922	3.973
	F5	45	131,810	2.929
	G5	43	107,730	2.505
	H5	37	110,294	2.981
	I5	42	109,020	2.596
	Total		1,074,199	2.919
	A6	35	133,522	3.815
	B6	35	129,816	3.709

Mezcla 6 Criollo	C6	38	112,138	2.951
	D6	57	236,238	4.145
	E6	44	138,182	3.141
	Total		749,896	3.552
Mezcla 7 Forastero	A7	28	51,316	1.833
	B7	35	56,490	1.614
	C7	24	67,812	2.826
	Total		175,618	2.091

Tabla N° 33. Temperaturas de las mezclas en fermentación ensayo 2

Temperatura ° C						
	Día 0	Día 1	Día 2	Día 3	Día 4	Día 5
Mezcla 1	28,40	29,00	28,70	27,50	26,20	26,10
	28,20	29,00	29,10	27,50	26,40	26,10
	28,50	29,00	29,20	27,60	26,40	26,10
Promedio	28,37	29,00	29,00	27,53	26,33	26,10
Mezcla 2	28,40	28,90	29,20	27,50	25,80	25,70
	28,70	28,90	29,20	27,50	26,10	25,80
	28,90	28,90	29,20	27,60	26,20	25,80
Promedio	28,67	28,90	29,20	27,53	26,03	25,77
Mezcla 3	28,60	28,80	28,70	27,00	25,90	25,90
	28,80	28,80	29,00	27,30	26,30	26,00
	28,70	28,80	29,10	27,30	26,40	26,10
Promedio	28,70	28,80	28,93	27,20	26,20	26,00
Mezcla 4	28,50	28,90	28,50	27,60	26,10	26,00
	28,60	29,00	29,00	27,80	26,30	26,10
	28,50	28,90	29,10	27,90	26,40	26,10
Promedio	28,53	28,93	28,87	27,77	26,27	26,07
Mezcla 5	28,80	28,90	28,90	27,60	26,10	25,90
	28,70	28,90	29,00	27,80	26,20	26,00
	28,50	28,90	29,10	27,70	26,20	26,00
Promedio	28,67	28,90	29,00	27,70	26,17	25,97
mezcla 6	29,20	29,10	29,10	27,20	25,90	26,20
	29,10	29,20	29,10	27,40	26,50	26,30
	29,00	29,20	29,10	27,40	26,60	26,40
Promedio	29,10	29,17	29,10	27,33	26,33	26,30
mezcla 7	28,70	28,90	25,50	27,70	26,20	26,10
	28,80	29,00	29,10	27,60	26,40	26,10
	28,80	29,90	29,10	27,70	26,40	26,00
Promedio	28,77	29,27	27,90	27,67	26,33	26,07

Tabla N° 34. Datos Obtenidos de pH de las mezclas en fermentación ensayo 2

Segundo ensayo						
pH						
	Día 0	Día 1	Día 2	Día 3	Día 4	Día 5
Mezcla 1	3,82	3,83	3,74	3,50	3,62	3,62
	3,80	3,84	3,74	3,51	3,61	3,61
	3,83	3,84	3,74	3,52	3,62	3,64
Promedio	3,82	3,84	3,74	3,51	3,62	3,62
Mezcla 2	3,82	3,82	3,69	3,59	3,62	3,65
	3,82	3,79	3,66	3,59	3,62	3,64
	3,80	3,89	3,67	3,57	3,60	3,63
Promedio	3,81	3,83	3,67	3,58	3,61	3,64
Mezcla 3	3,88	3,93	3,68	3,56	3,59	3,58
	3,87	3,88	3,69	3,55	3,58	3,57
	3,84	3,87	3,62	3,53	3,58	3,59
Promedio	3,86	3,89	3,66	3,55	3,58	3,58
Mezcla 4	3,90	4,00	3,60	3,52	3,57	3,56
	3,91	3,98	3,60	3,52	3,56	3,54
	3,90	3,94	3,61	3,52	3,56	3,55
Promedio	3,90	3,97	3,60	3,52	3,56	3,55
Mezcla 5	3,84	3,89	3,62	3,57	3,61	3,59
	3,85	3,85	3,65	3,56	3,61	3,59
	3,83	3,80	3,67	3,55	3,60	3,62
Promedio	3,84	3,85	3,65	3,56	3,61	3,60
Mezcla 6	4,40	4,27	3,59	3,42	3,41	3,44
	4,39	4,19	3,62	3,42	3,41	3,44
	4,39	4,24	3,61	3,43	3,42	3,43
Promedio	4,39	4,23	3,61	3,42	3,41	3,44
Mezcla 7	3,80	3,89	3,67	3,46	3,60	3,62
	3,81	3,90	3,66	3,49	3,59	3,58
	3,79	3,88	3,66	3,50	3,58	3,59
Promedio	3,80	3,89	3,66	3,48	3,59	3,60

Tabla N° 35. Lecturas de absorbancias obtenidas a 460nm en mezclas para índice de fermentación ensayo 2

Lecturas en absorbancias a 460 nm						
	Día 0	Día 1	Día 2	Día 3	Día 4	Día 5
Mezcla 1	0,372	0,443	0,290	0,167	0,250	0,391
	0,373	0,438	0,297	0,170	0,253	0,400
	0,371	0,432	0,292	0,161	0,260	0,381
Mezcla 2	0,358	0,466	0,314	0,314	0,300	0,304
	0,355	0,463	0,326	0,305	0,303	0,351
	0,364	0,462	0,334	0,307	0,303	0,335
Mezcla 3	0,340	0,454	0,201	0,302	0,240	0,341
	0,345	0,448	0,196	0,309	0,236	0,336
	0,343	0,457	0,198	0,293	0,244	0,326
Mezcla 4	0,371	0,232	0,320	0,199	0,404	0,280
	0,370	0,238	0,329	0,220	0,413	0,306
	0,368	0,237	0,325	0,221	0,412	0,304
Mezcla 5	0,432	0,286	0,240	0,302	0,388	0,270
	0,446	0,283	0,234	0,309	0,393	0,276
	0,440	0,283	0,241	0,316	0,390	0,262
Mezcla 6	0,533	0,477	0,267	0,300	0,412	0,367
	0,535	0,475	0,269	0,314	0,410	0,355
	0,534	0,467	0,269	0,318	0,411	0,350
Mezcla 7	0,329	0,382	0,199	0,404	0,441	0,360
	0,335	0,377	0,216	0,397	0,440	0,372
	0,334	0,383	0,210	0,402	0,436	0,371

En la tabla N° 35 se muestran los datos de absorbancias, obtenidas de las tres replicas, de cada mezcla de índice de fermentación, a una longitud de onda de 530 nm.

Tabla N° 36. Lecturas de absorbancias obtenidas a 530nm en las mezclas para índice de fermentación ensayo 2

Lecturas en absorbancias a 530 nm						
	Día 0	Día 1	Día 2	Día 3	Día 4	Día 5
Mezcla 1	0,516	0,688	0,393	0,194	0,308	0,352
	0,500	0,681	0,399	0,189	0,308	0,348
	0,530	0,675	0,398	0,190	0,307	0,349
Mezcla 2	0,548	0,369	0,505	0,582	0,484	0,195
	0,554	0,366	0,518	0,583	0,485	0,200
	0,548	0,367	0,523	0,587	0,489	0,198
Mezcla 3	0,536	0,564	0,210	0,422	0,311	0,270
	0,543	0,563	0,213	0,431	0,313	0,271
	0,554	0,573	0,217	0,425	0,312	0,273
Mezcla 4	0,556	0,272	0,482	0,238	0,456	0,223
	0,555	0,267	0,498	0,240	0,454	0,221
	0,557	0,277	0,492	0,237	0,456	0,218
Mezcla 5	0,771	0,307	0,213	0,441	0,396	0,183
	0,783	0,304	0,224	0,449	0,398	0,187
	0,780	0,304	0,222	0,438	0,396	0,187
mezcla 6	1,040	0,819	0,285	0,549	0,546	0,305
	1,040	0,823	0,306	0,548	0,547	0,303
	1,045	0,833	0,295	0,550	0,546	0,303
mezcla 7	0,555	0,677	0,271	0,648	0,700	0,325
	0,576	0,680	0,273	0,650	0,701	0,326
	0,551	0,677	0,272	0,655	0,704	0,328

En a la tabla N° 37 se muestra los resultados de la relación de la absorbancia a 460 nm entre la absorbancia a 530 nm.

Tabla N° 37. Relación de la absorbancia de 460nm entre la absorbancia de 530nm de las mezclas para índice de fermentación ensayo 2

Resultados de relación de absorbancias						
	Día 0	Día 1	Día 2	Día 3	Día 4	Día 5
Mezcla 1	0,721	0,644	0,738	0,861	0,812	1,111
	0,746	0,643	0,744	0,899	0,821	1,149
	0,700	0,640	0,734	0,847	0,847	1,092
promedio	0,722	0,642	0,739	0,869	0,827	1,117
Mezcla 2	0,653	1,263	0,622	0,540	0,620	1,559
	0,641	1,265	0,629	0,523	0,625	1,755
	0,664	1,259	0,639	0,523	0,620	1,692
promedio	0,653	1,262	0,630	0,529	0,621	1,669
Mezcla 3	0,634	0,805	0,957	0,716	0,772	1,263
	0,635	0,796	0,920	0,717	0,754	1,240
	0,619	0,798	0,912	0,689	0,782	1,194
promedio	0,630	0,799	0,930	0,707	0,769	1,232
Mezcla 4	0,667	0,853	0,664	0,836	0,886	1,256
	0,667	0,891	0,661	0,917	0,910	1,385
	0,661	0,856	0,661	0,932	0,904	1,394
promedio	0,665	0,867	0,662	0,895	0,900	1,345
Mezcla 5	0,560	0,932	1,127	0,685	0,980	1,475
	0,570	0,931	1,045	0,688	0,987	1,476
	0,564	0,931	1,086	0,721	0,985	1,401
promedio	0,565	0,931	1,086	0,698	0,984	1,451
mezcla 6	0,513	0,582	0,937	0,546	0,755	1,203
	0,514	0,577	0,879	0,573	0,750	1,172
	0,511	0,561	0,912	0,578	0,753	1,155
promedio	0,513	0,573	0,909	0,566	0,752	1,177
Mezcla 7	0,593	0,564	0,734	0,623	0,630	1,108
	0,582	0,554	0,791	0,611	0,628	1,141
	0,606	0,566	0,772	0,614	0,619	1,131
Promedio	0,594	0,561	0,766	0,616	0,626	1,127

Recuentos de microorganismos de las mezcla 1 a la 7 del ensayo 2

Tabla N° 38. Recuento de microorganismos mezcla 1 de fermentación ensayo 2

Mezcla 1						
UFC/mL						
	Día 0	Día 1	Día 2	Día 3	Día 4	Día 5
Bacterias lácticas	31,000	260,000	3,800,000	3,900,000	2,700,000	3,000,000
Bacterias acéticas en medio RAE	46,000	55,000	120,000	1,500,000	2,300,000	2,700,000
Hongos y levaduras	38,000	260,000	720,000	230,000	650,000	5,600,000
Bacterias aerobias	34,000	23,000	82,000	2,800,000	720,000	1,500,000
Bacterias acéticas en medio carbonato	130,000	490,000	1,000,000	4,200,000	3,900,000	3,400,000

Tabla N° 39. Recuento de microorganismos mezcla 2 de fermentación ensayo 2

Mezcla 2						
UFC/mL						
	Día 0	Día 1	Día 2	Día 3	Día 4	Día 5
Bacterias lácticas	100	3,300,000	2,600,000	4,500,000	200,000	2,300,000
Bacterias acéticas en medio RAE	33,000	38,000	54,000	3,100,000	4,500,000	9,600,000
Hongos y levaduras	27,000	250,000	250,000	240,000	850,000	1,500,000
Bacterias aerobias	31,000	290,000	200,000	440,000	500,000	900,000
Bacterias acéticas en medio carbonato	40,000	1,600,000	970,000	3,100,000	2,700,000	9,300,000

Tabla N° 40. Recuento de microorganismos mezcla 3 de fermentación ensayo 2

Mezcla 3						
UFC/mL						
	Día 0	Día 1	Día 2	Día 3	Día 4	Día 5
Bacterias lácticas	100	90,000	580,000	3,700,000	3,100,000	2,600,000
Bacterias acéticas en medio RAE	13,000	31,000	45,000	720,000	2,500,000	5,200,000
Hongos y levaduras	32,000	39000	290,000	230,000	3,000,000	1,100,000
Bacterias aerobias	240,000	300,000	370,000	1,100,000	520,000	2,800,000
Bacterias acéticas en medio carbonato	690,000	150,000	260,000	4,000,000	4,500,000	4,700,000

Tabla N° 41. Recuento de microorganismos mezcla 4 de fermentación ensayo 2

Mezcla 4						
UFC/mL						
	Día 0	Día 1	Día 2	Día 3	Día 4	Día 5
Bacterias lácticas	100	280,000	210,000	2,200,000	870,000	960,000
Bacterias acéticas en medio RAE	100	100	100	2,300,000	4,200,000	5,700,000
Hongos y levaduras	36,000	18,000	420,000	450,000	4,000,000	15,000,000
Bacterias aerobias	41,000	60,000	74,000	240,000	1,300,000	2,400,000
Bacterias acéticas en medio carbonato	1,900,000	1,400,000	150,000	3,800,000	5,500,000	6,800,000

Tabla N° 42. Recuento de microorganismos mezcla 5 de fermentación ensayo 2

Mezcla 5						
UFC/mL						
	Día 0	Día 1	Día 2	Día 3	Día 4	Día 5
Bacterias lácticas	100	830	410,000	1,400,000	2,100,000	3,000,000
Bacterias acéticas en medio RAE	100	160,000	290,000	6,200,000	7,800,000	8,100,000
Hongos y levaduras	39,000	320,000	190,000	150,000	760,000	1,300,000
Bacterias aerobias	46,000	350,000	360,000	630,000	600,000	3,200,000
Bacterias acéticas en medio carbonato	30,0000	780,000	1,800,000	2,500,000	5,700,000	5,500,000

Tabla N°43. Recuento de microorganismos mezcla 6 de fermentación ensayo 2

Mezcla 6						
UFC/mL						
	Día 0	Día 1	Día 2	Día 3	Día 4	Día 5
Bacterias lácticas	650	460,000	3,9000	840,000	270,000	3,500,000
Bacterias acéticas en medio RAE	100	100	3000	1,700,000	4,500,000	5,900,000
Hongos y levaduras	6,300	170,000	930,000	360,000	2,500,000	2,,200,000
Bacterias aerobias	18,000	500,000	800,000	630,000	620,000	350,000
Bacterias acéticas en medio carbonato	100,000	230,000	950,000	2,900,000	7,900,000	8,700,000

Tabla N°44. Recuento de microorganismos mezcla 7 de fermentación ensayo 2

Mezcla 7						
UFC/mL						
	Día 0	Día 1	Día 2	Día 3	Día 4	Día 5
Bacterias lácticas	8000	290,000	390,000	2,600,000	3,200,000	5,000,000
Bacterias acéticas en medio RAE	3000	48,000	72,000	2,500,000	6,000,000	1,300,000
Hongos y levaduras	180,000	180,000	1,300,000	390,000	1,100,000	9,300,000
Bacterias aerobias	37,000	250,000	2,100,000	800,000	430,000	230,000
Bacterias acéticas en medio carbonato	410,000	850,000	1,300,000	2,800,000	3,300,000	3,800,000

**Recuentos de microorganismos de las mezcla 1 a la 7 del ensayo 2 en
logaritmos**

Tabla N° 45. Recuentos de microorganismos en logaritmos de las mezclas
ensayo 2

Mezcla 1						
UFC/mL						
	Día 0	Día 1	Día 2	Día 3	Día 4	Día 5
B. lácticas	4,500	5,410	6,580	6,590	6,430	6,480
B. acéticas RAE	4,660	4,740	5,080	6,180	6,360	6,430
Hongos y levaduras	4,580	5,410	5,860	5,360	5,810	6,750
B. aerobias	4,530	4,360	4,910	6,450	5,860	6,180
B. acéticas carbonato	5,110	5,690	6,000	6,620	6,600	6,530
Mezcla 2						
UFC/mL						
	Día 0	Día 1	Día 2	Día 3	Día 4	Día 5
B. lácticas	2	6,520	6,410	6,650	5,300	6,360
B. acéticas RAE	4,520	4,580	4,730	6,490	6,650	6,980
Hongos y levaduras	4,430	5,400	5,400	5,380	5,930	6,180
B. aerobias	4,490	5,460	5,300	5,640	5,700	5,950
B. acéticas carbonato	4,600	6,200	5,990	6,490	6,430	6,700
Mezcla 3						
UFC/mL						
	Día 0	Día 1	Día 2	Día 3	Día 4	Día 5
B. lácticas	2	4,950	5,760	6,570	6,490	6,410
B. acéticas RAE	4,110	4,490	4,650	5,860	6,400	6,720
Hongos y levaduras	4,510	5	5,460	5,360	6,480	6,040
B. aerobias	5,380	5,480	5,570	6,040	5,720	6,450
B. acéticas carbonato	5,840	5,180	5,410	6,600	6,650	6,670
Mezcla 4						
UFC/mL						
	Día 0	Día 1	Día 2	Día 3	Día 4	Día 5
B. lácticas	2	5,450	5,320	6,340	5,940	5,980
B. acéticas RAE	2	2	2	6,360	6,620	6,760
Hongos y levaduras	4,560	4,260	5,620	5,650	6,600	6,180
B. aerobias	4,610	4,780	4,870	5,380	6,110	6,380
B. acéticas carbonato	6,280	6,150	5,180	6,580	6,740	6,830

Tabla N° 45. Continuación

Mezcla 5						
UFC/mL						
	Día 0	Día 1	Día 2	Día 3	Día 4	Día 5
B. lácticas	2	3	5,610	6,150	6,320	6,480
B. acéticas RAE	2	5,200	5,460	6,790	6,890	6,910
Hongos y levaduras	4,590	5,510	5,280	5,180	5,880	6,110
B. aerobias	4,660	5,540	5,560	5,800	5,780	6,510
B. acéticas carbonato	4,480	5,890	6,260	6,400	6,760	6,740
Mezcla 6						
UFC/mL						
	Día 0	Día 1	Día 2	Día 3	Día 4	Día 5
B. lácticas	2,81	5,660	3,590	5,920	5,430	6,540
B. acéticas RAE	2	2	3,48	6,230	6,650	6,770
Hongos y levaduras	3,800	5,230	5,970	5,560	6,400	6,340
B. aerobias	4,260	5,700	5,900	5,800	5,790	5,540
B. acéticas carbonato	5,000	5,360	5,980	6,460	6,900	6,940
Mezcla 7						
UFC/mL						
	Día 0	Día 1	Día 2	Día 3	Día 4	Día 5
B. lácticas	3,90	5,460	5,600	6,410	6,510	6,700
B. acéticas RAE	3,48	4,680	4,860	6,400	6,780	6,110
Hongos y levaduras	5,260	5,260	6,110	5,590	6,040	6,970
B. aerobias	4,570	5,400	6,320	5,900	5,630	5,360
B. acéticas carbonato	5,610	5,930	6,110	6,450	6,520	6,580

ANEXO N° 14

TABLAS DE RESULTADOS DE ENSAYO N° 3

Tabla N° 46. Números y pesos de semillas por frutos en mezclas ensayo 3

MEZCLA	FRUTO	SEMILLAS	PESO (g)	
Mezcla 1 Criollo	A1	28	152,00	5.429
	B1	38	186,60	4.911
	C1	35	104,40	2.983
	D1	39	127,60	3.272
	Total		570,60	4.149
Mezcla 2 Criollo	A2	33	113,70	3.249
	B2	23	78,90	3.43
	Total		192,60	3.339
Mezcla 3 Criollo	A3	35	125,80	3.594
	B3	39	85,10	2.182
	C3	37	140,40	3.795
	D3	35	55,70	1.591
	Total		407,00	2.791
Mezcla 4 Criollo	A4	39	134,60	3.451
	B4	45	148,30	3.296
	Total		282,90	3.374
Mezcla 5 Trinitario	A5	26	92,70	3.565
	B5	27	95,10	3.522
	C5	28	114,20	4.079
	D5	28	116,10	4.146
	Total		418,10	3.828
Mezcla 6 Criollo	A6	41	129,10	3.149
	B6	45	151,80	3.373
	C6	44	110,00	2.5
	D6	45	135,00	3.0
	Total		525,90	3.005
Mezcla 7 Criollo	A7	41	185,70	4.529
	B7	43	187,00	4.348
	C7	33	152,60	4.624
	D7	48	195,30	4.069
	Tota		720,60	4.392
Mezcla 8 Criollo	A8	36	109,30	3.036
	B8	40	143,20	3.58
		37	116,60	3.151

	D8	38	109,30	2.876
	Total		478,40	3.161

Tabla N° 47. Temperaturas obtenidas de las mezclas en fermentación ensayo 3

Temperatura ° C					
	Día 0	Día 1	Día 3	Día 4	Día 5
Mezcla 1	21,00	23,70	24,50	24,20	24,30
	21,50	23,60	24,70	24,40	24,50
	21,20	23,60	24,50	24,20	24,50
Promedio	21,23	23,60	24,60	24,27	24,43
Mezcla 2	21,30	23,40	24,40	23,90	24,30
	21,10	23,50	24,70	24,30	24,30
	21,20	23,40	24,60	24,00	24,30
Promedio	21,20	23,43	24,60	24,06	24,30
Mezcla 3	20,60	23,40	24,00	24,30	24,30
	21,00	23,60	24,50	24,80	24,60
	20,50	23,50	24,00	24,50	24,40
Promedio	20,70	23,50	24,20	24,53	24,40
Mezcla 4	21,20	23,60	24,40	24,30	24,40
	21,10	23,60	24,40	24,50	24,60
	21,30	23,70	24,40	24,40	24,40
Promedio	21,20	23,60	24,40	24,40	24,47
Mezcla 5	21,10	22,70	24,50	24,20	23,90
	21,10	23,40	24,60	24,40	24,50
	21,10	22,90	24,40	24,30	24,10
Promedio	21,10	23,00	24,50	24,30	24,17
Mezcla 6	21,50	31,80	30,90	36,80	44,00
	21,60	31,90	32,50	36,60	44,10
	21,40	31,90	32,30	36,50	44,00
Promedio	21,50	31,90	31,87	36,63	44,03
Mezcla 7	21,70	30,10	31,70	36,70	44,10
	21,80	30,20	32,50	36,80	44,20
	21,70	30,20	32,50	36,90	44,10
Promedio	21,70	30,20	32,50	36,80	44,13
Mezcla 8	21,70	32,40	31,50	35,70	44,20
	21,70	32,60	32,60	35,30	44,50
	21,80	32,50	32,00	35,50	44,10
Promedio	21,73	32,50	32,03	35,50	44,27

Tabla N° 48. pH Obtenido de las mezclas en fermentación ensayo 3

pH					
	Día 0	Día 1	Día 3	Día 4	Día 5
Mezcla 1	3,65	3,29	3,59	3,53	3,24
	3,59	3,31	3,59	3,53	3,29
	3,68	3,30	3,59	3,53	3,25
Promedio	3,64	3,30	3,59	3,53	3,26
Mezcla 2	3,72	3,36	3,38	3,28	3,11
	3,69	3,39	3,39	3,28	3,12
	3,68	3,35	3,37	3,28	3,11
Promedio	3,70	3,40	3,38	3,28	3,11
Mezcla 3	3,20	3,41	3,31	3,14	3,02
	3,16	3,40	3,27	3,14	3,03
	3,20	3,41	3,28	3,14	3,03
Promedio	3,19	3,41	3,29	3,14	3,03
Mezcla 4	3,53	3,14	3,44	3,41	3,31
	3,57	3,19	3,46	3,43	3,32
	3,53	3,15	3,45	3,42	3,31
Promedio	3,54	3,16	3,45	3,42	3,31
Mezcla 5	3,39	3,53	3,11	3,10	3,05
	3,34	3,53	3,13	3,10	3,08
	3,35	3,53	3,13	3,11	3,06
Promedio	3,36	3,53	3,12	3,10	3,06
Mezcla 6	5,49	4,56	4,15	4,74	5,07
	5,55	4,56	4,10	4,68	5,09
	5,50	4,57	4,12	4,70	5,08
Promedio	5,51	4,56	4,12	4,71	5,08
Mezcla 7	5,49	4,73	3,93	5,21	5,38
	5,50	4,72	3,91	5,23	5,35
	5,49	4,72	3,90	5,22	5,36
Promedio	5,49	4,72	3,91	5,22	5,36
Mezcla 8	5,51	4,85	4,24	4,72	5,57
	5,53	4,85	4,23	4,75	5,59
	5,48	4,85	4,23	4,73	5,50
Promedio	5,50	4,85	4,23	4,73	5,55

Tabla N° 49. Lecturas de absorbancias en las mezclas para índice de fermentación a 460nm ensayo 3

Lecturas en absorbancias a 460 nm					
	Día 0	Día 1	Día 3	Día 4	Día 5
Mezcla 1	0,374	0,433	0,169	0,254	0,393
	0,372	0,438	0,174	0,263	0,401
	0,381	0,431	0,162	0,261	0,386
Mezcla 2	0,361	0,468	0,313	0,305	0,295
	0,355	0,464	0,311	0,303	0,299
	0,362	0,465	0,308	0,304	0,301
Mezcla 3	0,341	0,460	0,302	0,243	0,343
	0,344	0,459	0,312	0,236	0,338
	0,341	0,458	0,295	0,254	0,332
Mezcla 4	0,374	0,234	0,197	0,409	0,287
	0,370	0,235	0,224	0,411	0,305
	0,371	0,237	0,223	0,410	0,309
Mezcla 5	0,432	0,288	0,304	0,387	0,271
	0,448	0,287	0,310	0,393	0,277
	0,442	0,284	0,311	0,393	0,263
	0,536	0,477	0,310	0,412	0,363
Mezcla 6	0,537	0,473	0,314	0,407	0,358
	0,541	0,469	0,320	0,411	0,352
	0,329	0,383	0,409	0,441	0,361
Mezcla 7	0,336	0,375	0,399	0,441	0,372
	0,334	0,386	0,331	0,438	0,370
	0,370	0,266	0,279	0,248	0,345
Mezcla 8	0,367	0,260	0,266	0,252	0,352
	0,362	0,268	0,275	0,252	0,344

Tabla N° 50. Lecturas de absorbancias en las mezclas para índice de fermentación a 530nm ensayo 3

Lecturas en absorbancias a 530 nm					
	Día 0	Día 1	Día 3	Día 4	Día 5
Mezcla 1	0,514	0,690	0,200	0,310	0,350
	0,510	0,683	0,192	0,305	0,349
	0,533	0,676	0,190	0,303	0,347
Mezcla 2	0,590	0,371	0,579	0,487	0,199
	0,554	0,376	0,580	0,492	0,210
	0,549	0,368	0,585	0,490	0,197
Mezcla 3	0,536	0,563	0,421	0,309	0,275
	0,541	0,566	0,432	0,316	0,268
	0,552	0,571	0,424	0,315	0,279
Mezcla 4	0,559	0,370	0,241	0,461	0,230
	0,551	0,365	0,240	0,457	0,221
	0,553	0,377	0,235	0,458	0,217
Mezcla 5	0,770	0,309	0,440	0,402	0,188
	0,782	0,303	0,452	0,399	0,189
	0,771	0,302	0,439	0,398	0,193
Mezcla 6	1,090	0,820	0,552	0,553	0,311
	1,030	0,824	0,548	0,552	0,306
	1,041	0,831	0,553	0,546	0,309
Mezcla 7	0,555	0,678	0,644	0,704	0,327
	0,555	0,680	0,651	0,699	0,331
	0,554	0,673	0,658	0,701	0,324
Mezcla 8	0,792	0,532	0,330	0,382	0,241
	0,795	0,531	0,336	0,380	0,235
	0,796	0,536	0,338	0,373	0,236

Tabla N° 51. Relación de la absorbancia de 460nm entre la absorbancia de 530nm de las mezclas para índice de fermentación ensayo 3

Resultados de relación de absorbancias					
	Día 0	Día 1	Día 3	Día 4	Día 5
	0,728	0,628	0,845	0,819	1,123
Mezcla 1	0,729	0,641	0,906	0,862	1,149
	0,715	0,638	0,853	0,861	1,112
Promedio	0,724	0,635	0,868	0,848	1,128
	0,612	1,261	0,541	0,626	1,482
Mezcla 2	0,641	1,234	0,536	0,616	1,424
	0,659	1,264	0,526	0,620	1,528
Promedio	0,637	1,253	0,534	0,621	1,478
	0,636	0,817	0,717	0,786	1,247
Mezcla 3	0,636	0,811	0,722	0,747	1,261
	0,618	0,802	0,696	0,806	1,190
Promedio	0,630	0,810	0,712	0,780	1,233
	0,669	0,632	0,817	0,887	1,248
Mezcla 4	0,672	0,644	0,933	0,899	1,380
	0,671	0,629	0,949	0,895	1,424
Promedio	0,670	0,635	0,900	0,894	1,351
	0,561	0,932	0,691	0,963	1,441
Mezcla 5	0,573	0,947	0,686	0,985	1,466
	0,573	0,940	0,708	0,987	1,363
Promedio	0,569	0,940	0,695	0,978	1,423
	0,492	0,582	0,562	0,745	1,167
Mezcla 6	0,521	0,574	0,573	0,737	1,170
	0,520	0,564	0,579	0,753	1,139
Promedio	0,511	0,573	0,571	0,745	1,159
	0,593	0,565	0,635	0,626	1,104
Mezcla 7	0,605	0,551	0,613	0,631	1,124
	0,603	0,574	0,503	0,625	1,142
Promedio	0,600	0,563	0,584	0,627	1,123
	0,467	0,500	0,845	0,649	1,432
Mezcla 8	0,462	0,490	0,792	0,663	1,498
	0,455	0,500	0,814	0,676	1,458
Promedio	0,461	0,497	0,817	0,663	1,462

Recuentos de microorganismos de las mezcla 1 a la 8 del ensayo 3

Tabla N° 52. Recuento de microorganismos en muestra 1 ensayo 3

Mezcla 1					
UFC/mL					
	Día 0	Día 1	Día 3	Día 4	Día 5
Bacterias lácticas	1,000	69,000	610,000	850,000	3,600,000
Bacterias acéticas RAE	1,600	230,000	350,000	380,000	3,500,000
Hongos y levaduras	140,000	180,000	700,000	500,000	730,000
Bacterias aerobias	3,400	500,000	840,000	650,000	940,000
Bacterias acéticas Carbonato	1,000	1,000	1,500,000	10,000	2,600,000

Tabla N° 53. Recuento de microorganismos en mezcla 2 ensayo 3

Mezcla 2					
UFC/mL					
	Día 0	Día 1	Día 3	Día 4	Día 5
Bacterias lácticas	1,000	320,000	3,500,000	2,500,000	4,000,000
Bacterias acéticas RAE	1,000	49,000	1,700,000	2,000,000	3,100,000
Hongos y levaduras	30,000	190,000	300,000	550,000	4,300,000
Bacterias aerobias	30,000	35,000	1,500,000	700,000	1,000,000
Bacterias acéticas Carbonato	80,000	320,000	2,700,000	3,400,000	4,000,000

Tabla N° 54. Recuento de microorganismos en mezcla 3 ensayo 3

Mezcla 3					
UFC/mL					
	Día 0	Día 1	Día 3	Día 4	Día 5
Bacterias lácticas	1,000	2,800,000	3,900,000	1,600,000	3,100,000
Bacterias acéticas RAE	30,000	40,000	2,500,000	4,300,000	9,100,000
Hongos y levaduras	21,000	300,000	350,000	820,000	2,000,000
Bacterias aerobias	40,000	350,000	480,000	500,000	830,000
Bacterias acéticas Carbonato	50,000	1,000,000	2,800,000	2,500,000	8,200,000

Tabla N° 55. Recuento de microorganismos en mezcla 4 ensayo 3

Mezcla 4					
UFC/mL					
	Día 0	Día 1	Día 3	Día 4	Día 5
Bacterias lácticas	1,000	60,000	2,700,000	710,000	3,200,000
Bacterias acéticas RAE	1,000	30,000	460,000	700,000	750,000
Hongos y levaduras	100,000	200,000	4,000,000	5,000,000	2,500,000
Bacterias aerobias	3,000	130,000	1,500,000	4,700,000	5,100,000
Bacterias acéticas Carbonato	1,000	1,000	6,500,000	3,500,000	4,100,000

Tabla N° 56. Recuento de microorganismos en mezcla 5 ensayo 3

Mezcla 5					
UFC/mL					
	Día 0	Día 1	Día 3	Día 4	Día 5
Bacterias lácticas	1,000	4000,000	2,000,000	4,300,000	2,700,000
Bacterias acéticas RAE	14,000	250,000	7,200,000	10,000	3,800,000
Hongos y levaduras	230,000	270,000	1,800,000	8,700,000	4,800,000
Bacterias aerobias	10,000	2,300,000	5,000,000	3,700,000	6,300,000
Bacterias acéticas Carbonato	42,000	50,000	5,600,000	2,700,000	3,500,000

Tabla N° 57. Recuento de microorganismos en mezcla 6 ensayo 3

Mezcla 6					
UFC/mL					
	Día 0	Día 1	Día 3	Día 4	Día 5
Bacterias lácticas	1,000	90,000	1,800,000	420,000	12,000,000
Bacterias acéticas RAE	21,000	320,000	2,400,000	370,000	2,000,000
Hongos y levaduras	180,000	2,800,000	2,900,000	4,100,000	4,600,000
Bacterias aerobias	31,000	4,300,000	4,800,000	5,300,000	8,200,000
Bacterias acéticas Carbonato	1,000	1,000	740,000	560,000	3,800,000

Tabla N° 58. Recuento de microorganismos en mezcla 7 ensayo 3

Mezcla 7					
UFC/mL					
	Día 0	Día 1	Día 3	Día 4	Día 5
Bacterias lácticas	1,000	2,300,000	1,200,000	70,000	3,500,000
Bacterias acéticas RAE	12,000	410,000	760,000	70,000	3,100,000
Hongos y levaduras	90,000	210,000	7,300,000	3,500,000	10,000,000
Bacterias aerobias	15,000	880,000	3,700,000	530,000	6,200,000
Bacterias acéticas Carbonato	1,000	52,000	4,200,000	230,000	2,500,000

Tabla N° 59. Recuento de microorganismos en mezcla 8 ensayo 3

Mezcla 8					
UFC/mL					
	Día 0	Día 1	Día 3	Día 4	Día 5
Bacterias lácticas	1,000	72,000	920,000	800,000	4,500,000
Bacterias acéticas RAE	1,000	62,000	1,800,000	2,100,000	320,000
Hongos y levaduras	39,000	280,000	7,500,000	3,300,000	5,200,000
Bacterias aerobias	100,000	1,900,000	5,200,000	1,800,000	3,800,000
Bacterias acéticas Carbonato	1,000	1,000	6,500,000	6,300,000	3,700,000

Recuentos de microorganismos de las mezcla 1 a la 8 del ensayo 3 en logaritmos

Tabla N° 60. Recuento de microorganismos en logaritmos ensayo 3

Mezcla 1					
UFC/mL					
	Día 0	Día 1	Día 3	Día 4	Día 5
B. lácticas	3,000	4,840	5,790	5,930	6,560
B. acéticas RAE	3,200	5,360	5,540	5,580	6,540
Hongos y levaduras	5,150	5,260	5,850	5,700	5,860
B. aerobias	3,530	5,700	5,920	5,810	5,970
B. acéticas Carbonato	3,000	3,000	6,180	4,000	6,410
Mezcla 2					
UFC/mL					
	Día 0	Día 1	Día 3	Día 4	Día 5
B. lácticas	3,000	5,510	6,540	6,400	6,600
B. acéticas RAE	3,000	4,690	6,230	6,300	6,490
Hongos y levaduras	4,480	5,280	5,480	5,740	6,630
B. aerobias	4,480	4,540	6,180	5,850	6,000
B. acéticas Carbonato	4,900	5,510	6,430	6,530	6,600
Mezcla 3					
UFC/mL					
	Día 0	Día 1	Día 3	Día 4	Día 5
B. lácticas	3,000	6,450	6,590	6,200	6,490
B. acéticas RAE	4,480	4,600	6,400	6,630	6,960
Hongos y levaduras	4,320	5,480	5,540	5,910	6,300
B. aerobias	4,600	5,540	5,680	5,700	5,920
B. acéticas Carbonato	4,700	6,000	6,450	6,400	6,910
Mezcla 4					
UFC/mL					
	Día 0	Día 1	Día 3	Día 4	Día 5
B. lácticas	3,000	4,780	6,430	5,850	6,510
B. acéticas RAE	3,000	4,480	5,660	5,850	5,880
Hongos y levaduras	5,000	5,300	6,600	6,700	6,400
B. aerobias	3,480	5,110	6,180	6,670	6,710
B. acéticas Carbonato	3,000	3,000	6,810	6,540	6,610

Tabla N° 60. Continuación

Mezcla 5					
UFC/mL					
	Día 0	Día 1	Día 3	Día 4	Día 5
B. lácticas	3,000	6,600	6,300	6,630	6,430
B. acéticas RAE	4,150	5,400	6,860	4,000	6,580
Hongos y levaduras	5,360	5,430	6,260	6,940	6,680
B. aerobias	4,000	6,360	6,700	6,570	6,800
B. acéticas Carbonato	4,620	4,700	6,750	6,430	6,540
Mezcla 6					
UFC/mL					
	Día 0	Día 1	Día 3	Día 4	Día 5
B. lácticas	3,000	4,950	6,260	5,620	7,080
B. acéticas RAE	4,320	5,510	6,380	5,570	6,300
Hongos y levaduras	5,260	6,450	6,460	6,610	6,660
B. aerobias	4,490	6,630	6,680	6,720	6,910
B. acéticas Carbonato	3,000	3,000	5,870	5,750	6,580
Mezcla 7					
UFC/mL					
	Día 0	Día 1	Día 3	Día 4	Día 5
B. lácticas	3,000	6,360	6,080	4,850	6,540
B. acéticas RAE	4,080	5,610	5,880	4,850	6,490
Hongos y levaduras	4,950	5,320	6,860	6,540	7,000
B. aerobias	4,180	5,940	6,570	5,720	6,790
B. acéticas Carbonato	3,000	4,720	6,620	5,360	6,400
Mezcla 8					
UFC/mL					
	Día 0	Día 1	Día 3	Día 4	Día 5
B. lácticas	3,000	4,860	5,960	5,900	6,650
B. acéticas RAE	3,000	4,790	6,260	6,320	5,510
Hongos y levaduras	4,590	5,450	6,880	6,520	6,720
B. aerobias	5,000	6,280	6,720	6,260	6,580
B. acéticas Carbonato	3,000	3,000	6,810	6,800	6,570

ANEXO N° 15

TABLAS DE RESULTADOS DE ENSAYO N° 4

Tabla N° 61. Temperaturas obtenidas de las muestras en fermentación ensayo
4

Temperatura ° C						
	0	1	2	3	4	5
Muestra 1.1	30,00	30,50	29,60	30,50	42,50	36,40
	30,00	30,40	29,70	30,40	42,50	36,50
	30,00	30,50	29,50	30,50	42,40	36,40
Promedio	30,00	30,50	29,60	30,50	42,47	36,40
Muestra 1.2	40,00	40,10	34,30	36,90	36,10	44,10
	40,00	40,00	34,10	36,80	36,30	44,20
	40,00	40,10	34,00	37,00	36,10	44,20
Promedio	40,00	40,10	34,10	36,90	36,17	44,20
Muestra 2.1	30,00	30,10	29,00	28,90	44,10	36,10
	30,00	30,20	29,20	28,90	44,20	36,20
	30,00	30,00	29,00	28,70	44,20	36,10
Promedio	30,00	30,10	29,00	28,83	44,23	36,10
Muestra 2.2	40,00	38,10	36,70	40,30	37,60	46,80
	40,00	38,00	36,50	40,10	37,50	46,70
	40,00	38,00	36,70	40,00	37,60	46,70
Promedio	40,00	38,00	36,63	40,13	37,60	46,70
Muestra 3.1	30,00	30,00	28,70	29,70	45,10	36,20
	30,00	30,00	28,50	29,70	45,00	36,30
	30,00	30,10	28,50	29,80	45,00	36,40
Promedio	30,00	30,00	28,57	29,73	45,00	36,30
Muestra 3.2	40,00	40,00	36,30	38,70	45,10	47,30
	40,00	40,10	36,20	38,70	45,20	47,00
	40,00	40,00	36,30	38,80	45,10	47,10
Promedio	40,00	40,00	36,30	38,73	45,10	47,13

Tabla N° 62. pH Obtenido de las muestras en fermentación ensayo 4

pH						
	0	1	2	3	4	5
Muestra 1.1	5,51	4,43	4,03	4,26	5,35	4,81
	5,54	4,45	4,02	4,27	5,30	4,81
	5,51	4,40	4,00	4,28	5,31	4,82
Promedio	5,52	4,43	4,02	4,27	5,32	4,81
Muestra 1.2	5,54	4,60	3,92	3,92	4,77	5,40
	5,51	4,61	3,90	3,90	4,79	5,41
	5,50	4,62	3,90	3,93	4,75	5,40
Promedio	5,52	4,61	3,91	3,92	4,77	5,40
Muestra 2.1	5,59	4,69	4,25	4,41	5,42	5,42
	5,58	4,68	4,26	4,40	5,41	5,42
	5,55	4,68	4,28	4,43	5,40	5,42
Promedio	5,57	4,68	4,26	4,41	5,41	5,42
Muestra 2.2	5,50	4,68	4,56	4,12	4,26	4,95
	5,52	4,69	4,55	4,10	4,28	4,96
	5,50	4,69	4,53	4,14	4,27	4,96
Promedio	5,51	4,69	4,55	4,12	4,27	4,96
Muestra 3.1	5,30	4,30	4,09	4,45	5,33	5,31
	5,50	4,31	4,08	4,46	5,32	5,32
	5,20	4,33	4,05	4,45	5,32	5,31
Promedio	5,33	4,31	4,07	4,45	5,32	5,31
Muestra 3.2	5,60	4,70	4,69	4,01	4,24	5,00
	5,50	4,71	4,68	4,02	4,28	5,00
	5,50	4,73	4,69	4,00	4,26	5,20
Promedio	5,53	4,71	4,69	4,01	4,26	5,07

Tabla N° 63. Lecturas obtenidas en absorbancias de las muestras en fermentación a 460 nm ensayo 4.

Lecturas en absorbancias a 460 nm						
	Día 0	Día 1	Día 2	Día 3	Día 4	Día 5
Muestra 1.1	0,487	0,591	0,345	0,393	0,242	0,360
	0,486	0,589	0,347	0,381	0,239	0,372
	0,490	0,589	0,345	0,390	0,237	0,371
Muestra 1.2	0,275	0,359	0,313	0,292	0,304	0,381
	0,282	0,359	0,315	0,293	0,333	0,341
	0,288	0,358	0,315	0,294	0,313	0,371
Muestra 2.1	0,355	0,262	0,563	0,438	0,441	0,327
	0,355	0,264	0,579	0,440	0,440	0,325
	0,356	0,264	0,572	0,439	0,436	0,330
Muestra 2.2	0,384	0,325	0,147	0,298	0,261	0,343
	0,391	0,325	0,148	0,302	0,259	0,345
	0,391	0,323	0,144	0,298	0,263	0,340
Muestra 3.1	0,351	0,368	0,231	0,282	0,300	0,346
	0,350	0,369	0,230	0,288	0,303	0,339
	0,359	0,367	0,231	0,293	0,303	0,345
Muestra 3.2	0,367	0,264	0,306	0,268	0,252	0,350
	0,366	0,261	0,304	0,275	0,250	0,348
	0,370	0,262	0,307	0,255	0,253	0,349

Tabla N° 64. Lecturas en absorbancias obtenidas de muestras en fermentación a 530 nm ensayo 4

Lecturas en absorbancias a 530 nm						
	Día 0	Día 1	Día 2	Día 3	Día 4	Día 5
Muestra 1.1	1,253	1,516	0,758	0,751	0,320	0,242
	1,262	1,524	0,761	0,759	0,328	0,260
	1,271	1,537	0,761	0,758	0,330	0,248
Muestra1.2	0,554	0,847	0,619	0,391	0,464	0,244
	0,557	0,853	0,623	0,392	0,463	0,243
	0,553	0,852	0,626	0,388	0,460	0,244
Muestra 2.1	0,815	0,600	1,601	0,917	0,700	0,252
	0,820	0,600	1,611	0,918	0,701	0,250
	0,823	0,602	1,611	0,919	0,704	0,255
Muestra 2.2	0,871	0,828	0,145	0,395	0,342	0,268
	0,884	0,834	0,153	0,405	0,344	0,264
	0,883	0,832	0,152	0,413	0,340	0,267
Muestra 3.1	0,786	0,728	0,503	0,515	0,456	0,236
	0,796	0,748	0,527	0,506	0,454	0,232
	0,787	0,750	0,509	0,497	0,456	0,233
Muestra 3.2	0,791	0,531	0,571	0,329	0,372	0,242
	0,797	0,533	0,602	0,339	0,378	0,243
	0,798	0,532	0,580	0,338	0,369	0,239

Tabla N° 65. Promedio de la relación de la absorbancia de 460 nm entre la absorbancia de 530 nm obtenidas de la muestras de fermentación ensayo 4

Promedio de absorbancias para cada mezcla						
	Día 0	Día 1	Día 2	Día 3	Día 4	Día 5
Muestra 1.1	0,389	0,390	0,455	0,523	0,756	1,488
	0,385	0,386	0,456	0,502	0,729	1,431
	0,386	0,383	0,453	0,515	0,718	1,496
Promedio	0,386	0,387	0,455	0,513	0,734	1,471
Muestra 1.2	0,496	0,424	0,506	0,747	0,655	1,561
	0,506	0,421	0,506	0,747	0,719	1,403
	0,521	0,420	0,503	0,758	0,680	1,520
Promedio	0,508	0,422	0,505	0,751	0,685	1,495
Muestra 2.1	0,436	0,437	0,352	0,478	0,630	1,298
	0,433	0,440	0,359	0,479	0,628	1,300
	0,433	0,439	0,355	0,478	0,619	1,294
Promedio	0,434	0,438	0,355	0,478	0,626	1,297
Muestra 2.2	0,441	0,393	1,014	0,754	0,763	1,280
	0,442	0,390	0,967	0,746	0,753	1,307
	0,443	0,388	0,947	0,722	0,774	1,273
Promedio	0,442	0,390	0,976	0,741	0,763	1,287
Muestra 3.1	0,447	0,505	0,459	0,548	0,658	1,466
	0,440	0,493	0,436	0,569	0,667	1,461
	0,456	0,489	0,454	0,590	0,664	1,481
Promedio	0,447	0,496	0,450	0,569	0,663	1,469
Muestra 3.2	0,464	0,497	0,536	0,815	0,677	1,446
	0,459	0,490	0,505	0,811	0,661	1,432
	0,464	0,492	0,529	0,754	0,686	1,460
Promedio	0,462	0,493	0,523	0,793	0,675	1,446

Recuentos de microorganismos de las mezcla del ensayo 4

Tabla N° 66. Recuento de microorganismos de la muestra 1.1 en fermentación ensayo 4

Muestra 1.1						
UFC/mL						
	Día 0	Día 1	Día 2	Día 3	Día 4	Día 5
Bacterias lácticas	1,000	71,000	570,000	640,000	90,000	4,200,000
Bacterias acéticas RAE	1,000	180,000	720,000	390,000	320,000	4,100,000
Hongos y levaduras	143,000	200,000	910,000	690,000	560,000	700,000
Bacterias aerobias	3,000	450,000	1,000,000	940,000	700,000	1,000,000
Bacterias acéticas carbonato	1,000	1,000	24,000	1,700,000	10,000	2,200,000

Tabla N° 67. Recuento de microorganismos de la muestra 2.1 en fermentación ensayo 4

Muestra 2.1						
UFC/mL						
	Día 0	Día 1	Día 2	Día 3	Día 4	Día 5
Bacterias lácticas	1,000	4,600,000	3,000,000	1,800,000	400,000	2,200,000
Bacterias acéticas RAE	1,000	270,000	570,000	8,100,000	10,000	2,100,000
Hongos y levaduras	340,000	250,000	180,000	2,600,000	9,800,000	1,300,000
Bacterias aerobias	12,000	2,600,000	500,000	5,500,000	2,300,000	7,100,000
Bacterias acéticas carbonato	37,000	55,000	290,000	6,900,000	1,400,000	3,700,000

Tabla N° 68. Recuento de microorganismos de la muestra 3.1 en fermentación ensayo 4

Muestra 3.1						
UFC/mL						
	Día 0	Día 1	Día 2	Día 3	Día 4	Día 5
Bacterias lácticas	1,000	2,900,000	2,900,000	1,600,000	120,000	3,500,000
Bacterias acéticas RAE	1,000	350,000	870,000	720,000	30,000	2,300,000
Hongos y levaduras	150,000	120,000	780,000	9,100,000	3,100,000	18,000,000
Bacterias aerobias	11,000	850,000	820,000	4,200,000	330,000	5,700,000
Bacterias acéticas carbonato	1,000	42,000	1,900,000	2,500,000	100,000	2,,900,000

Tabla N° 69. Recuento de microorganismos de la muestra 1.2 en fermentación ensayo 4.

Muestra 1.2						
UFC/mL						
	0	1	2	3	4	5
Bacterias lácticas	1,000	63,000	3,200,000	2,800,000	510,000	4,100,000
Bacterias acéticas RAE	1,000	23,000	500,000	420,000	530,000	640,000
Hongos y levaduras	120,000	190,000	130,000	3,500,000	6,800,000	2,300,000
Bacterias aerobias	3,000	170,000	1,400,000	1,300,000	4,600,000	4,500,000
Bacterias acéticas carbonato	1,000	1,000	1,000	8,600,000	2,400,000	3,200,000

Tabla N° 70. Recuento de microorganismos de la muestra 2.2 en fermentación ensayo 4

Muestra 2.2						
UFC/mL						
	Día 0	Día 1	Día 2	Día 3	Día 4	Día 5
Bacterias lácticas	1,000	100,000	2,300,000	2,400,000	380,000	15,000,000
Bacterias acéticas RAE	1,500	280,000	31,000	2,900,000	160,000	1,900,000
Hongos y levaduras	160,000	2,200,000	150,000	1,800,000	3,500,000	3,600,000
Bacterias aerobias	24,000	5,000,000	1,000,000	4,400,000	4,900,000	8,900,000
Bacterias acéticas carbonato	1,000	1,000	96,000	670,000	450,000	5,000,000

Tabla N° 71. Recuento de microorganismos de la muestra 3.2 en fermentación ensayo 4.

Muestra 3.2						
UFC/mL						
	Día 0	Día 1	Día 2	Día 3	Día 4	Día 5
Bacterias lácticas	1,000	67,000	1,000,000	840,000	500,000	5,900,000
Bacterias acéticas RAE	1,000	66,000	1,000,000	1,300,000	1,400,000	270,000
Hongos y levaduras	43,000	220,000	390,000	8,600,000	2,400,000	450,000
Bacterias aerobias	130,000	3,100,000	540,000	4,600,000	980,000	350,000
Bacterias acéticas carbonato	1,000	1,000	290,000	7,900,000	750,000	2,000,000

Recuentos de microorganismos de las mezcla del ensayo 4 en logaritmos

Tabla N° 72. Recuentos de microorganismos en logaritmos ensayo 4

Muestra 1.1						
UFC/mL						
	Día 0	Día 1	Día 2	Día 3	Día 4	Día 5
B. lácticas	3,000	4,850	5,760	5,810	4,950	6,620
B. acéticas RAE	3,000	5,260	5,860	5,590	5,510	6,610
Hongos y levaduras	5,160	5,300	5,960	5,840	5,750	5,850
B. aerobias	3,480	5,650	6,000	5,970	5,850	6,000
B. acéticas Carbonato	3,000	3,000	4,380	6,230	4,000	6,340
Muestra 2.1						
UFC/mL						
	Día 0	Día 1	Día 2	Día 3	Día 4	Día 5
B. lácticas	3,000	6,660	6,480	6,260	5,600	6,340
B. acéticas RAE	3,000	5,430	5,760	6,910	4,000	6,320
Hongos y levaduras	5,530	5,400	5,260	6,410	7,000	6,110
B. aerobias	4,080	6,410	5,700	6,740	6,360	6,850
B. acéticas Carbonato	4,570	4,740	5,460	6,840	6,150	6,570
Muestra 3.1						
UFC/mL						
	Día 0	Día 1	Día 2	Día 3	Día 4	Día 5
B. lácticas	3,000	6,460	6,460	6,200	5,080	6,540
B. acéticas RAE	3,000	5,540	5,940	5,860	4,480	6,360
Hongos y levaduras	5,180	5,080	5,890	6,960	6,490	7,260
B. aerobias	4,040	5,930	5,910	6,620	5,520	6,760
B. acéticas Carbonato	3,000	4,620	6,280	6,400	5,000	6,460
Muestra 1.2						
UFC/mL						
	0	1	2	3	4	5
B. lácticas	3,000	4,800	6,510	5,450	5,710	6,610
B. acéticas RAE	3,000	4,360	5,700	5,620	5,720	5,810
Hongos y levaduras	5,080	5,280	5,110	6,540	6,830	6,360
B. aerobias	3,480	5,230	6,150	6,110	6,660	6,650
B. acéticas Carbonato	3,000	3,000	3,000	6,930	6,380	6,510

Muestra 2.2						
UFC/mL						
	Día 0	Día 1	Día 2	Día 3	Día 4	Día 5
Bacterias lácticas	3,000	5,000	6,360	6,380	5,580	7,180
Bacterias acéticas RAE	3,180	5,450	4,490	6,460	5,200	6,280
Hongos y levaduras	5,200	6,340	5,180	6,260	6,540	6,560
Bacterias aerobias	4,380	6,700	6,000	6,640	6,690	6,950
Bacterias acéticas carbonato	3,000	3,000	4,980	5,830	5,650	6,700
Muestra 3.2						
UFC/mL						
	Día 0	Día 1	Día 2	Día 3	Día 4	Día 5
Bacterias lácticas	3,000	4,830	6,000	5,920	5,700	6,770
Bacterias acéticas RAE	3,000	4,820	6,000	6,110	6,150	5,430
Hongos y levaduras	4,630	5,340	5,590	6,930	6,380	5,650
Bacterias aerobias	5,110	6,490	5,730	6,660	6,000	5,540
Bacterias acéticas carbonato	3,000	3,000	5,460	6,900	5,880	6,300

ANEXO Nº 16
CARTA DE ENTREGA DE EJEMPLAR DE INVESTIGACIÓN

Ciudad Universitaria, 13 de octubre de 2015

Gerencia del cultivar San José
del Real de La Carrera
Presente

Mediante la presente hacemos cumplimiento a uno de los objetivos específicos de nuestra tesis titulada "Estandarización del proceso de fermentación de la mezcla de semillas de tres accesiones de *Theobroma cacao* L. (cacao) del cultivar San José del Real de La Carrera ubicada en el departamento de Usulután" el cual se lee de la siguiente manera:

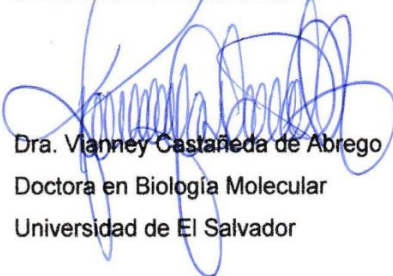
2.2.5 Entregar un ejemplar de la investigación a la gerencia del cultivar San José del Real de La Carrera en Usulután.

Por tanto se hace entrega de un ejemplar de la investigación para su disposición.

Nos despedimos, no sin antes agradecer por su apertura y cordialidad brindada durante la recolecta de las muestras de frutos de cacao, vitales para esta investigación.


Br. Cesar Amílcar Alas Rivera
Estudiante de Facultad de química y Farmacia
Universidad de El Salvador


Br. Argentina Morales Solórzano
Estudiante de la Facultad de Química y Farmacia
Universidad de El Salvador


Dra. Vianney Castañeda de Abrego
Doctora en Biología Molecular
Universidad de El Salvador


MSc. Amy Elieth Morán
Maestra en Investigación de Medicamentos
Universidad de El Salvador