



UNIVERSIDAD TÉCNICA DEL NORTE

**FACULTAD DE INGENIERÍA EN CIENCIAS AGROPECUARIAS Y
AMBIENTALES**

CARRERA DE AGROINDUSTRIA

**INFORME FINAL DEL TRABAJO DE INTEGRACIÓN
CURRICULAR, MODALIDAD PROYECTO DE INVESTIGACIÓN**

TEMA:

**“EVALUACIÓN DEL USO DE ENZIMAS PECTINOLÍTICAS
PRESENTES EN RESIDUOS DE CÍTRICOS EN EL PROCESO DE
FERMENTACIÓN DEL CACAO (*Theobroma cacao L.*)”**

Trabajo de titulación previo a la obtención del título de Ingeniero en Agroindustria

Línea de investigación: Gestión, Producción, Productividad, Innovación y desarrollo socioeconómico.

Autor: Franklin Stiven Flores Dávila.

Director: Ing. Jimmy Núñez Pérez, MSc.

Ibarra – 2023



UNIVERSIDAD TÉCNICA DEL NORTE BIBLIOTECA UNIVERSITARIA

AUTORIZACIÓN DE USO Y PUBLICACIÓN A FAVOR DE LA UNIVERSIDAD TÉCNICA DEL NORTE

1. IDENTIFICACIÓN DE LA OBRA

En cumplimiento del Art. 144 de la Ley de Educación Superior, hago la entrega del presente trabajo a la Universidad Técnica del Norte para que sea publicado en el Repositorio Digital Institucional, para lo cual pongo a disposición la siguiente información:

DATOS DE CONTACTO			
CÉDULA IDENTIDAD:	DE	1004226245	
APELLIDOS NOMBRES:	Y	Flores Dávila Franklin Stiven	
DIRECCIÓN:		Ibarra	
EMAIL:		fsfloresdl@utn.edu.ec	
TELÉFONO FIJO:		-----	TELÉFONO MÓVIL: 0967196913

DATOS DE LA OBRA	
TÍTULO:	Evaluación del uso de enzimas pectinolíticas presentes en residuos de cítricos en el proceso de fermentación del cacao (<i>Theobroma cacao L.</i>)
AUTOR:	Flores Dávila Franklin Stiven
FECHA: DD/MM/AAAA	22/11/2023
SOLO PARA TRABAJOS DE GRADO	
PROGRAMA:	<input checked="" type="checkbox"/> PREGRADO <input type="checkbox"/> POSGRADO
TÍTULO POR EL QUE OPTA:	Ingeniero Agroindustrial
DIRECTOR:	Ing. Jimmy Núñez Pérez MSc.

2. CONSTANCIAS

El autor manifiesta que la obra objeto de la presente autorización es original y se la desarrolló, sin violar derechos de autor de terceros, por lo tanto, la obra es original y que es el titular de los derechos patrimoniales, por lo que asume la responsabilidad sobre el contenido de la misma y saldrá en defensa de la Universidad en caso de reclamación por parte de terceros.

Ibarra, a los veintidós días del mes de noviembre de 2023

EL AUTOR:

(Firma) 
Franklin Stiven Flores Dávila

CERTIFICACIÓN DIRECTOR DEL TRABAJO DE INTERGRACIÓN CURRICULAR

Ibarra, 22 de noviembre de 2023

Ing. Jimmy Núñez, MSc.

DIRECTOR DEL TRABAJO DE INTEGRACIÓN CURRICULAR

CERTIFICA:

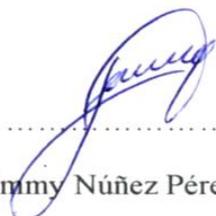
Haber revisado el presente informe final del trabajo de Integración Curricular, el mismo que se ajusta a las normas vigentes de la Universidad Técnica del Norte; en consecuencia, autorizo su presentación para los fines legales pertinentes.

.....
Ing. Jimmy Núñez Pérez, MSc.

C.C.: 1756606339

APROBACIÓN DEL COMITÉ CALIFICADOR

El Comité Calificado del Trabajo de Integración Curricular “**EVALUACIÓN DEL USO DE ENZIMAS PECTINOLÍTICAS PRESENTES EN RESIDUOS DE CÍTRICOS EN EL PROCESO DE FERMENTACIÓN DEL CACAO (*Theobroma cacao L.*)**” elaborado por Flores Dávila Franklin Stiven, previo a la obtención del título del Ingeniero Agroindustrial, aprueba el presente informe de investigación en nombre de la Universidad Técnica del Norte:



.....
Ing. Jimmy Núñez Pérez, MSc.

C.C.: 1756606339



.....
PhD. José M. País Chanfrau

C.C.: 0959747320

DEDICATORIA

Esta dedicación refleja el compromiso, autodisciplina, el deseo inquebrantable de alcanzar metas y la convicción de que todo es posible con arduo trabajo.

Amada mamá, Conchita Margoth, este logro es suyo también, que por su amor y sacrificio me ha impulsado a culminar esta etapa de vida, mi más profundo respeto y admiración para ella, que con su ejemplo de madre siempre me inspiró a trabajar fuerte para alcanzar mis objetivos y nunca dudó de mis capacidades. También a mi hermano, Andrés, por quien también espero mejorar cada día y servir de ejemplo para su vida.

A mis abuelos, Cesar y Bertilda, por su infinito amor y cariño desde que tengo memoria, de quienes siempre estaré orgulloso por su ejemplo de vida, y sin lugar a duda agradezco a Dios por ser ellos como mis padres también. A mis tíos, Diego y Cenón por su incondicional apoyo moral y también material los cuales fueron también un pilar fundamental para alcanzar este logro.

A todos y cada uno de los miembros de mi familia que de una u otra manera siempre sus buenos deseos fueron esenciales.

A mis amigos por su compañía en los buenos y malos momentos, por esas risas y anécdotas incontables, que la amistad siempre perdure.

Stiven

AGRADECIMIENTO

A Dios, quien ha sido mi refugio en los momentos difíciles, por llenarme de fortaleza, por guiarme en el camino del conocimiento y la sabiduría.

A mi madre Conchita Margoth, por su amor, paciencia e inquebrantable apoyo lo cual ha sido el pilar fundamental de mi crecimiento y éxito. Este logro es testimonio no solo de mi esfuerzo sino también de la influencia positiva que ella ha tenido en cada etapa de mi vida. A mis queridos abuelos, cuyos valores y sabiduría me han enseñado la importancia del trabajo arduo, la perseverancia y de cultivar relaciones significativas. Mi más sincero agradecimiento a mis tíos, Diego, Cenón, que pese a la distancia o cualquier dificultad siempre tuve su apoyo absoluto.

A la Universidad Técnica del Norte por brindarme los medios y facilidades para forjarme como un profesional con talento y orgulloso de haber pertenecido al alma mater.

A mi director de tesis Ing. Jimmy Núñez, asesor PhD. José M. País Chanfrau, por su guía inestimable y apoyo constante a lo largo de mi investigación. A los docentes de la carrera, gracias por su orientación y dedicación, lo cual contribuyó positivamente en mi desarrollo profesional.

Franklin

RESUMEN EJECUTIVO

El cacao (*Theobroma cacao L.*) consumido ampliamente a nivel mundial y altamente considerado popular a nivel nacional e internacional por sus apreciadas características sensoriales como el sabor y propiedades funcionales, mismas que se generan en la etapa de fermentación, generalmente este proceso tarda de 6 a 7 días para el clon CCN51. Existen alternativas para reducir este tiempo, como la adición de compuestos microbianos y adicionando enzimas pectinolíticas comerciales al bioproceso. El estudio consistió en evaluar el uso de estas enzimas presentes en residuos de cítricos en el proceso de fermentación del cacao con la finalidad de reducir el tiempo fermentativo. La parte metodológica constó de estandarizar (triturado, secado y actividad enzimática) los residuos de cáscara de naranja para, seguido de evaluar diferentes proporciones de harina de cáscara de naranja (HRN) en el proceso de fermentación y finalmente de optimizar dichas proporciones. En cuanto a resultados se observó que todos los tratamientos (T2, T3 y T4) respecto al testigo presentaron un efecto significativo disminuyendo el tiempo de fermentación, siendo el más relevante el T2 (2% m/m de HRN), por otro lado, con la optimización numérica se determinó que la cantidad de HRN necesaria para cubrir la semilla de cacao es de 1.2% m/m de la masa total. Concluyendo que la harina de cáscara de naranja, esta presentó efecto pectinolítico, aportando significativamente al bioproceso y reduciendo el tiempo de fermentación aproximadamente en un 20% respecto a la fermentación natural.

Palabras clave: cacao, enzimas pectinolíticas, índice de fermentación, pH.

ABSTRACT

Cocoa (*Theobroma cacao* L.), widely consumed worldwide and highly regarded on both a national and international level for its esteemed sensory characteristics such as flavor and functional properties, which arise during the fermentation stage. Typically, this process takes 6 to 7 days for the CCN51 clone. There are alternatives to reduce this time, such as the addition of microbial compounds and the incorporation of commercial pectinolytic enzymes into the bioprocess. The study aimed to evaluate the use of these enzymes found in citrus waste in the cocoa fermentation process to reduce fermentation time. The methodological phase involved standardizing (crushing, drying, and enzymatic activity) orange peel waste, followed by evaluating different proportions of orange peel flour (HRN) in the fermentation process and ultimately optimizing these ratios. Regarding results, all treatments (T2, T3, and T4) compared to the control showed a significant effect in reducing fermentation time, with T2 (2% m/m of HRN) being the most relevant. Additionally, numerical optimization determined that the required HRN quantity to cover the cocoa seed is 1.2% m/m of the total mass. In conclusion, orange peel flour exhibited a pectinolytic effect, significantly contributing to the bioprocess and reducing fermentation time by approximately 20% compared to natural fermentation.

Keywords: cocoa, pectinolytic enzymes, fermentation index, pH.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

INTRODUCCIÓN	14
PROBLEMA.....	14
JUSTIFICACIÓN	15
OBJETIVOS	16
Objetivo general.....	16
Objetivos específicos	16
HIPÓTESIS.....	16
Alternativa.....	16
Nula.....	16
CAPÍTULO I	17
MARCO TEÓRICO.....	17
1.1 Cacao.....	17
1.1.1 Taxonomía	17
1.1.2 Variedades De Cacao En Ecuador	18
1.1.3 Propiedades Físicas y Químicas de los Granos de Cacao sin Fermentar.....	19
1.1.4 Composición Química de los Granos de Cacao.....	21
1.2 Fermentación del Cacao.....	22
1.2.1 Fases de la Fermentación	24
1.2.2 Bioquímica de la Fermentación	25
1.2.3 Enzimas del Cacao Durante la Fermentación	26
1.2.4 Fermentación Estado Sólido (SSF).....	27
1.2.5 Factores que Influyen en la Fermentación	28
1.3 Enzimas	30
1.3.1 Enzima Pectinolítica	30

	10
1.4 La Naranja	31
1.4.1 Cáscara de Naranja	32
1.5 Azúcares Reductores	33
1.5.1 Determinación de Azúcares Reductores (prueba DNS).....	33
1.6 Índice de Fermentación (IF).....	34
1.6.1 Determinación del Índice de Fermentación	34
CAPÍTULO II.....	36
METODOLOGÍA.....	36
2.1 Caracterización del área de estudio.....	36
2.2 Materiales y Equipos.....	37
2.2.1 Materiales.....	37
2.2.2 Equipos	37
2.2.3 Insumos	38
2.2.4 Reactivos.....	38
2.3 Métodos.....	38
2.3.1 Estandarización de los Residuos de Cítricos	39
2.3.2 Determinación de las Proporciones de Mezcla de Cáscara de Naranja y Granos de Cacao en el Proceso de Fermentación.	42
2.3.3 Optimización de la Proporción de Mezcla en el Proceso de Fermentación.....	45
2.4 Manejo Específico del Experimento	47
2.4.1 Descripción del Proceso de la Fermentación de los Granos de Cacao	48
CAPÍTULO III.....	50
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	50
3.1 Estandarización de los residuos de cítricos	50
3.1.1 Análisis Físicoquímicos	50

3.2	Determinación de las Proporciones de Mezcla de Cáscara de Naranja y Granos de Cacao en el Proceso de Fermentación.	53
3.2.1	pH.....	53
3.2.2	Índice de Fermentación (IF).....	54
3.2.3	Relación del pH Respecto al Índice de Fermentación	56
3.2.4	Cinética de la Fermentación.....	57
3.3	Optimización de la Proporción de Mezcla en el Proceso de Fermentación	60
CAPÍTULO IV.....		63
CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES		63
4.1	Conclusiones	63
4.2	Recomendaciones.....	63
BIBLIOGRAFÍA		64
ANEXOS		75

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1 <i>Clasificación Taxonómica del cacao</i>	18
Tabla 2 <i>Componentes químicos de la pulpa de cacao</i>	20
Tabla 3 <i>Composición química del grano de cacao</i>	21
Tabla 4 <i>Composición química del mucílago de cacao antes y después de la fermentación</i>	22
Tabla 5 <i>Principales enzimas durante la fermentación de cacao</i>	26
Tabla 6 <i>Composición fisicoquímico de la cáscara de naranja</i>	32
Tabla 7 <i>Escala para determinar el índice de fermentación del cacao</i>	35
Tabla 8 <i>Localización del experimento</i>	36
Tabla 9 <i>Variables cuantitativas para análisis fisicoquímico</i>	39
Tabla 10 <i>Factores para el diseño experimental</i>	43
Tabla 11 <i>Descripción de tratamientos en estudio</i>	43
Tabla 12 <i>Métodos utilizados para la determinación de variables de investigación</i>	44
Tabla 13 <i>Análisis fisicoquímicos de la harina de cáscara de naranja</i>	50
Tabla 14 <i>Valores de pH del grano de cacao</i>	53
Tabla 15 <i>Índice de fermentación del cacao en los diferentes tratamientos</i>	55
Tabla 16 <i>Tiempo y cinética de fermentación obtenidos del modelo integral</i>	58
Tabla 17 <i>Mediciones de la semilla con mucílago en relación a los semiejes</i>	62

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 <i>Variedad de cacao nacional</i>	17
Figura 2 <i>Cacao CCN51</i>	19
Figura 3 <i>El pH de fermentación como precursor del sabor del cacao y el chocolate</i>	23
Figura 4 <i>Cambios en el cotiledón y pulpa del cacao durante la fermentación</i>	26
Figura 5 <i>Formación del complejo enzima-sustrato</i>	30
Figura 6 <i>Diagrama de proceso para la cáscara de naranja</i>	40
Figura 7 <i>Esquema del reactor utilizado en la fermentación</i>	45
Figura 8 <i>Representación geométrica de las semillas de cacao</i>	46
Figura 9 <i>Diagrama de proceso de la fermentación</i>	47
Figura 10 <i>Relación del pH respecto al índice de fermentación (IF)</i>	57
Figura 11 <i>Relación del tiempo de fermentación con la cantidad de HRN</i>	59
Figura 12 <i>Relación de la cinética de fermentación con la cantidad de HRN</i>	60
Figura 13 <i>Semilla de cacao con partículas de HRN</i>	61

INTRODUCCIÓN

PROBLEMA

La fermentación es uno de los procesos agroindustriales precursores de la calidad del sabor y aroma del cacao *Theobroma cacao L.* (Rios & Lévano, 2022). A nivel mundial los precios del cacao varían constantemente por lo que los agricultores al querer aprovechar los mejores costos comercializan granos de baja calidad por el deficiente o nulo proceso de fermentación manejado, esto debido a que el bioproceso natural dura de 5 a 7 días. Por otra parte, se sabe que con aplicación de enzimas pectinolíticas, se puede mejorar y acelerar el proceso de fermentación del cacao (Rahardjo et al., 2022).

Un proceso inadecuado de fermentación hace que pierdan características organolépticas de calidad del cacao (Campoverde & Zambrano, 2019). De forma particular, en Ecuador el híbrido CCN-51 es caracterizado por su alto rendimiento productivo (Navia & Natalie, 2012). Sin embargo, debido a su baja calidad organoléptica y sabores secundarios, ha disminuido su rentabilidad (Otárola, 2018). Por otra parte, en la industria el 50% de la naranja es residuo, generando así alrededor de 71 mil toneladas anuales de desechos en Ecuador (Muñoz Briones et al., 2021). Los residuos de cítricos por su alta humedad y contenido de azúcares fermentables representan un elevado poder contaminante (Serrat Díaz et al., 2016).

Los pequeños y medianos productores de cacao manejan técnicas tradicionales post cosecha, donde no se controlan tiempos y condiciones de fermentación, esto debido al difícil acceso de nuevas tecnologías de procesos, una de estas es la aplicación de enzimas en el proceso de fermentación, pero su aplicación demanda directamente de disponibilidad de recursos económicos ya que no se producen enzimas pectinas en el Ecuador por tanto hay que importarlas.

Es así que para la mayoría de productores no ha sido posible mejorar el rendimiento productivo y calidad de las almendras de cacao, lo que conlleva a los productores a comercializarlos como una mezcla de variedades, y consigo recibir menos beneficio económico por parte de los intermediarios (García et al., 2021).

JUSTIFICACIÓN

Según (Peñaherrera, 2021) menciona que con la aplicación de métodos controlados durante fermentación y demás procesos posteriores, el híbrido CCN51 puede lograr las propiedades físicas, químicas y sensoriales de calidad. Los pequeños y medianos productores de cacao requieren de tecnologías de fermentación específicas, que sean accesibles, rápidas y poco costosas. En base a lo mencionado por (Rahardjo et al., 2022), una alternativa viable para optimizar los procesos de fermentación, es la adición de enzimas externas, para el caso de estudio se plantea utilizar residuos procedentes de la agroindustria (cáscaras de naranja) ya que se conoce que estas contienen representativas cantidades de enzimas pectinasas las cuales pueden ayudar en la remoción del mucílago de las almendras de cacao y mejorar las características organolépticas.

El presente estudio busca contribuir a la mejora de los procesos de fermentación de productores del híbrido CCN51 evaluando el uso de residuos del cítrico, y de esta manera incentivar el aprovechamiento de los residuos de la naranja como alternativas de valorización. Además, se podrá dar paso a estudios posteriores de secado, tostado, molienda y almacenamiento para la conservación del polvo obtenido de la semilla de cacao, tanto para empresas fermentadoras, como para los agricultores independientes, mediante el manejo de una metodología adecuada y accesible.

En un contexto general, la investigación ayudará a la parte agroalimentaria mejorando el proceso productivo del cacao y de esta manera impulsar las exportaciones del mismo, la sustitución de importación de enzimas, aportar en beneficio del medio ambiente ya que, con el aprovechamiento de los residuos de la cáscara de naranja, se pretende mitigar la contaminación por residuos generados de la agroindustria, de esta manera se intenta potenciar la productividad interna de los agricultores cacaoteros nacionales e internacionales.

OBJETIVOS

Objetivo general

Evaluar el uso de enzimas pectinolíticas presentes en los residuos de cítricos en el proceso de fermentación del cacao (*Theobroma cacao L.*)

Objetivos específicos

- Estandarizar los residuos de cítricos.
- Determinar las proporciones de mezcla de cáscara de naranja (*Citrus sinensis*) y granos de cacao en el proceso de fermentación.
- Optimizar la proporción de mezcla en el proceso de fermentación.

HIPÓTESIS

Alternativa

Ha: La proporción de cáscaras de naranja y semillas de cacao influyen en el tiempo de fermentación.

Nula

Ho: La proporción de cáscaras de naranja y semillas de cacao no influyen en el tiempo de fermentación.

CAPÍTULO I

MARCO TEÓRICO

1.1 Cacao

El fruto del cacao, conocido como vaina o mazorca, es sostenido por el pedúnculo a la planta, generalmente su forma es ovalada, lo cual depende de la variedad, las cuales van de fusiformes a esféricas. Al igual que forma, el color también depende de la especie, siendo el color básico amarillo oscuro o rojo claro (Guevara, 2017).

Figura 1

Variedad de cacao nacional



Tomado de: (Guevara, 2017)

1.1.1 Taxonomía

En la tabla 1 se establece la clasificación taxonómica del cacao según su orden taxonómico.

Tabla 1*Clasificación Taxonómica del cacao*

Descripción taxonómica del cacao	
Reino	Plantae
División	<i>Magnoliophyta</i>
Clase	<i>Magnoliopsida</i>
Orden	<i>Malvales</i>
Familia	<i>Sterculiaceae</i>
Género	<i>Theobroma</i>
Especie	<i>T, Cacao</i>

Tomado de: (Alvarado, 2021)

1.1.2 Variedades De Cacao En Ecuador

En Ecuador, los agricultores utilizan dos tipos de cacao: el cacao CCN-51 y el criollo, también conocido como Fino de Aroma Nacional. Según las estadísticas proporcionadas por Pro-Ecuador, el criollo es ampliamente aceptado a nivel internacional como la variedad de Fino de Aroma más destacada. Este tipo de cacao representa aproximadamente el 80% de la actividad agrícola del país (Alvarado, 2021).

1.1.2.1 Cacao CCN51

Caracterizado por su resistencia, alto rendimiento y contenido graso, se ubica como uno de los clones más apreciados a nivel internacional (Alvarado, 2021). Sus mazorcas (fruto) en estado tierno presentan un color rojizo-moradas, y rojizo anaranjadas en su estado de madurez comercial (Navia & Natalie, 2012). La mazorca tiene forma de baya de 30 cm y 10 cm de largo y diámetro, respectivamente, los colores son variantes, ya que pueden ser rojo, amarillos, morado o café. Los colores característicos de la pulpa suelen ser blanca, rosada o café; su sabor es ácido, dulce y

aromático. El número de semillas por baya oscila entre los 20 a 40 y pueden ser planas o redondeadas (Lucero, 2021). Según (Zapata Arevalo, 2002) el clon CCN51 tiene un tiempo de fermentación de 138 h con un 88% de granos fermentados, un porcentaje de almendras llenas del 74,27%, además un promedio de almendras por mazorca del 44,7%.

Figura 2

Cacao CCN51



Tomado de: (Fajardo, 2019)

Otras características del clon CCN51, la semilla tiene un índice de 1.4 g, mientras que el índice de mazorca es de 13 mazorcas por kilogramo de cacao seco. Los componentes químicos, presenta un contenido de grasa del 55%, 14% de proteína y un 15 % de cáscara.

1.1.3 Propiedades Físicas y Químicas de los Granos de Cacao sin Fermentar

1.1.3.1 Pulpa o mucílago

Es la capa que recubre las semillas, formada por el endocarpio y principalmente consiste en células alargadas con grandes vacuolas. En frutos en estado de madurez óptimo la pulpa es mucilaginosa y olor aromático, los inmaduros, la pulpa es de color blanco a amarillento; en frutos

demasiado maduros la pulpa se vuelve en una capa delgada y reduce su contenido de humedad; por tanto, para una buena fermentación, es importante definir el estado de la pulpa ya que esta es el sustrato básico para los microorganismos (bacterias y levaduras). En la tabla 2 se muestran los componentes químicos principales.

Tabla 2

Componentes químicos de la pulpa de cacao

Nutriente	Composición % (m/m)
Agua	84.4
Masa seca	15.6
Azúcares totales	11
- Fructosa	- 4.8
- Glucosa	- 4.5
Grasa	1.6
Proteína-N	0.2
Ácido cítrico	1 - 3
Pectina	1 – 1.5
Pentosanos	2 – 3

Tomado de: (Jürgen & Reinhard, 2014)

1.1.3.2 Cascara o testa

Parte de la semilla de cacao que representa del 10 al 14% del grano seco de cacao, se deriva de los tegumentos del ovulo y consta de dos capas estructurales distintas, mediante estas existe la importación de compuestos y su importación a partir de la semilla.

1.1.3.3 Granos

Los granos, que se componen de cotiledones y embrión (86-90% del peso del grano seco), son la fuente del sabor y aroma distintivos del cacao. Existen dos tipos de células de

almacenamiento, que contienen lípidos y proteínas, o polifenoles y alcaloides. Los rasgos de las células lipo-proteicas son varias vacuolas pequeñas llenas de lípidos, proteínas o gránulos en las primeras etapas. No obstante, las células de polifenoles (14 a 20% del peso del grano seco) se distinguen por una gran vacuola central que contiene polifenoles, cafeína, teobromina y teofilina.

1.1.4 Composición Química de los Granos de Cacao

En las tablas 3 se muestran la composición química del grano de cacao.

Tabla 3

Composición química del grano de cacao

Componente	% p/p
Manteca de cacao	54
Proteína	11.5
Ácidos orgánicos y aromas	9.5
Celulosa	9
Ácidos tánicos y color	6
Agua	5
Sales minerales	2.6
Teobromina	1.2
Azúcares	1
Cafeína	0.2

Tomado de: (Ortiz & Álvarez, 2015)

La tabla 4 muestra la comparativa de la composición química de los granos de cacao antes y después del proceso de fermentación.

Tabla 4*Composición química del mucílago de cacao antes y después de la fermentación*

Componente	Antes de la fermentación (%)	Después de la fermentación (%)
Agua	82-87	45-47
Sacarosa	12	0
Ácido cítrico	1-2	0.5
Pectina	1-1.5	-
pH	3.7	6.5
Alcohol etílico	-	0.5
Ácido acético	-	1.6

Tomado de: (Fajardo, 2019)

1.2 Fermentación del Cacao

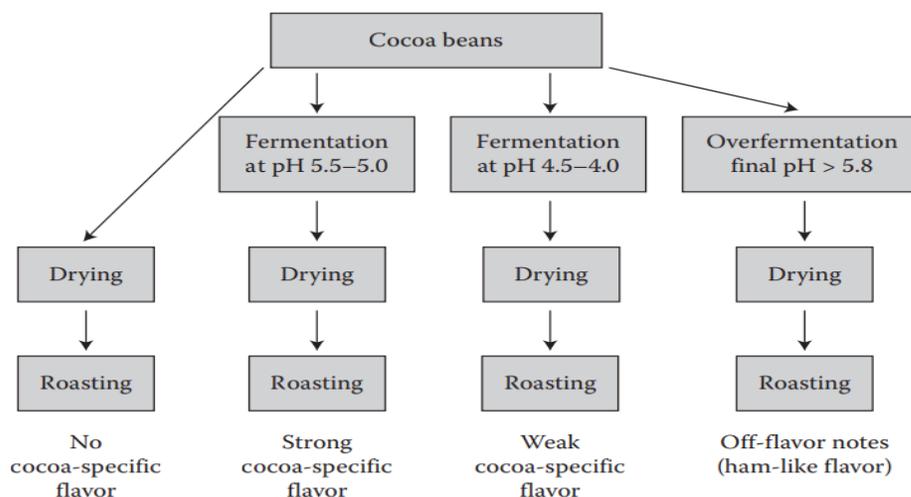
Según (Quezada et al., 2017) el estado de madurez al momento de la cosecha influye en el índice de fermentación de los granos. La calidad final del chocolate depende del genotipo de cacao y operaciones postcosecha, de las cuales, la fermentación se considera la etapa central de todo el proceso de transformación, aunque muchos de los productores del tercer mundo manejan esta etapa con poca o ninguna tecnificación, donde no se controlan las condiciones del proceso, esto genera baja y heterogénea calidad de los granos. Es importante resaltar que ningún país productor ha industrializado la etapa de postcosecha de cacao de semilla a grano (Santander Muñoz et al., 2020).

La calidad del cacao crudo depende en gran medida del tiempo y que tan acidificados se encuentran los cotiledones durante el proceso de fermentación, así como sobre la duración del proceso de fermentación y el pH final. Según (Sinche Bosquez, 2013) menciona que inicialmente

a la fermentación el pH de la pulpa y cotiledón de las almendras frescas es de 3.5 y 6.5, respectivamente; así también, que un grano de calidad debe tener un pH entre 5.1 y 5.4. El potencial de sabor se reduce considerablemente por la sobre fermentación (Figura 3). En estas condiciones, las bacterias aerofílicas metabolizan aminoácidos y péptidos, lo que provoca un fuerte aumento del pH del grano, la liberación de ácidos grasos volátiles y el desarrollo de un olor a jamón (Jürgen & Reinhard, 2014).

Figura 3

El pH de fermentación como precursor del sabor del cacao y el chocolate



Tomado de: (Jürgen & Reinhard, 2014)

Es necesario que previo a la fermentación retirar cierta cantidad de pulpa para evitar un exceso de concentración de azúcares fermentables, lo cual ocasiona cualidades organolépticas negativas por el exceso de ácido generado por la actividad microbiana. La reducción de mucílago o pulpa se puede efectuar por vía mecánica o mediante la acción de enzimas pectinolíticas, para los dos casos, se recomienda retirar un porcentaje de pulpa entre el 10% y el 30%, preferentemente un rango ente 20-25% (Cocom Cantú, 2021).

Es importante conocer el contenido inicial de azúcar en la pulpa de los granos de cacao, el cual debe ser de mínimo 15 °Brix (Pérez & Contreras, 2017). El primer desperdicio de la fermentación del cacao es el mucílago, en esta parte del proceso se denomina exudado, con hasta el 9.48% del peso húmedo inicial. Al finalizar la fermentación los granos deben estar hinchados y con un cambio de color más oscuro que al inicio (Fajardo, 2019).

1.2.1 Fases de la Fermentación

La fase alcohólica (anaerobia) es donde se inician las levaduras anaerobias, que atacan los azúcares de la pulpa durante las primeras 48 horas después de abrir la mazorca, convirtiéndolos en alcohol. Para que se inicie este fenómeno deben existir condiciones de baja tensión de oxígeno, alto contenido de azúcar y temperatura ambiente moderada o alta. El pH es de 4.5 y la temperatura alcanza aproximadamente los 45 °C. Por esta razón, el cacao fresco debe apilarse en contenedores, dado el volumen de masa de cacao fresco, restringiendo el flujo de aire y manteniendo la temperatura. Aunque esta etapa es anaerobia, la falta total de oxígeno puede conducir a la formación de más ácidos láctico y butírico de lo esperado, comprometiendo el sabor final del grano.

En la fase acética (aerobia), dado que el alcohol se forma a partir de la fermentación del azúcar, y la temperatura (entre 48 a 51°C) y el pH aumentan (pH interno de semillas 4.5 y pulpa 6), las bacterias del ácido acético que utilizan el alcohol para fermentar en condiciones aeróbicas (condiciones aeróbicas) comienzan a dominar. La concentración de ácido acético aumenta, dando como resultado el olor característico del vinagre. El ácido acético se adentra en la semilla e inician los cambios bioquímicos con los compuestos internos, especialmente los polifenoles, que se

caracterizan por su sabor violeta, astringente y amargo. La temperatura ideal del proceso de fermentación acética está entre 28 y 30 °C y el pH óptimo es de 4,5 (Teneda Llerena, 2017).

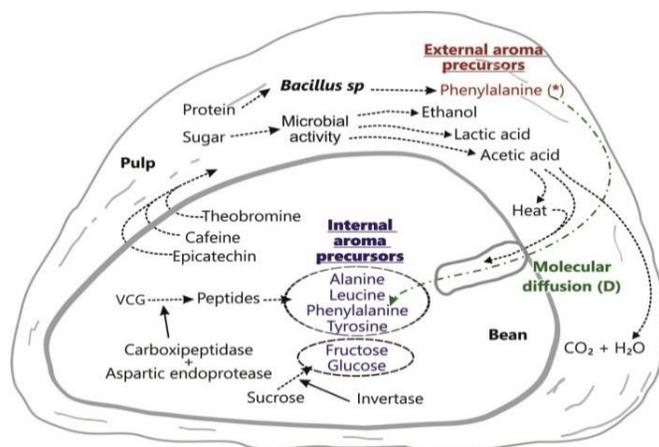
Finalmente la fase oxidativa, en esta etapa, la humedad libre se reduce significativamente y se mejoran las condiciones generales de aireación, lo que crea diferencias en la concentración de ácido acético entre el interior y el exterior de la semilla. La fermentación del ácido acético se reduce en este punto porque no hay más alcohol para convertir, y las modificaciones físicas y bioquímicas continúan en el interior del grano, en particular debido a la degradación de los polifenoles (reducción de astringencia), la reducción del color violeta (degradación de antocianinas), la reducción de alcaloides (reduce el amargor), quinonas sintéticas (coloración marrón) (Pérez & Contreras, 2017).

1.2.2 Bioquímica de la Fermentación

Durante la fermentación se produce etanol y ácido acético a altas temperaturas que oscilan 45 – 50 °C matan al embrión. La figura 4 representa la interacción de los diferentes componentes químicos dentro de grano de cacao.

Figura 4

Cambios en el cotiledón y pulpa del cacao durante la fermentación



Tomado de: (Castro-Alayo et al., 2019)

1.2.3 Enzimas del Cacao Durante la Fermentación

Las enzimas (tabla 5) provocan el aumento de aminoácidos libres y azúcares reductores lo que provoca la disminución de la sacarosa. Gracias al incremento de la temperatura de 25 °C a 50 °C aproximadamente, permite acelerar las reacciones enzimáticas dentro del grano (Sinche Bosquez, 2013).

Tabla 5

Principales enzimas durante la fermentación de cacao

Enzima	Localización	Sustrato	Producto	pH	T(°C)
Invertasa	Semilla, testa	Sacarosa	Glucosa, fructosa	4-5.2	52, 37
Glicosidasa (β-galactosidasa)	Semilla, cotiledones	Glucósidos (3-β-D-galactosidilcianidina, 3-α-L-arabinosidilcianidina)	Cianidina, azúcares	3.8- 4.5	45

Proteasas	Semillas, cotiledones, fragmentos	Proteínas	Péptidos, aminoácidos	4.7	55
Polifenoloxid asa	Semilla, cotiledones	Polifenoles (epicatequina)	o-quinonas, o-diquinonas	6	31.5 – 34.5

Tomado de: (Sinche Bosquez, 2013)

1.2.4 Fermentación Estado Sólido (SSF)

Según (Llombart, 2021) la SSF consiste en el crecimiento de microorganismos sobre sustratos sólidos rodeados por una fase gaseosa continua en ausencia o casi ausencia de agua libre. La SSF, debido a su mayor eficiencia en la conversión del sustrato al producto final, se destaca como un proceso sostenible, menos propenso a contaminaciones debido a su baja actividad de agua, y con métodos de extracción del producto final que son más económicos y simples. Además, favorece la bioconversión de residuos orgánicos u otros sustratos para obtener metabolitos biológicamente activos.

En la fermentación del cacao, el cual, a través de levaduras, bacterias lácticas y acéticas, se producen ácidos y otros compuestos fundamentales para sus propiedades finales (Chávez, 2017). En el caso de la fermentación del café, la SSF consiste en depositar en el fermentador los granos de café despulpado sin adicionar agua (Puerta & Echeverry, 2015). La SSF no presenta agua libre en su estructura, aunque conlleva determinados requerimientos de humedad, específicamente durante el bioproceso se controlan condiciones de humedad, pH, aireación y temperatura (Borrás-Sandoval & Torres-Vidales, 2016).

1.2.5 Factores que Influyen en la Fermentación

En el proceso de fermentación del cacao, se pueden identificar varios factores que desempeñan un papel crucial en la calidad tanto fisicoquímica como organoléptica de los granos y, en última instancia, del producto final, es decir, el chocolate. El grano de cacao marrón (excelente fermentación); parte púrpura-marrón (buena fermentación); púrpura (algunas fermentaciones); pizarra (mala fermentación) (Binh et al., 2012). Los más relevantes son los que se describen:

En el tipo de fermentador, los más usados son: sacos, montones, cajones (madera, plástico), tambor giratorio. El sistema comúnmente utilizado son los cajones de madera, ya que en el proceso de fermentación se eleva la temperatura y al utilizar otro material como aluminio o plástico, en la noche se enfría provocando un gradiente de temperatura muy elevado lo cual perjudica la fermentación del cacao (Ramos, 2019). Por otro lado, según (Vílchez Vargas, 2017) no existe diferencia significativa en cuanto al tipo de material (acero, aluminio y plástico) a utilizar para el proceso de fermentación de los granos de cacao CCN51, comparados con el de madera.

El tiempo del bioproceso, la fermentación espontánea dura aproximadamente de 5 a 7 días, a excepción de algunas variedades o híbridos que requieren menos tiempo como el criollo y arriba (Caligiani et al., 2016). Respecto al híbrido CCN 51 (Horta-Téllez et al., 2019) mencionan que las semillas alcanzan una buena fermentación a los seis días. Depende del genotipo, y es directamente proporcional al porcentaje de pulpa y contenido de polifenoles en los granos de cacao, de estos últimos depende la astringencia y amargor del grano, aunque en mayor grado por el contenido de purinas (teobromina [1-4% m/m] y cafeína [0.1-0.5% m/m]). También depende de la coloración de las almendras, ya que mientras más violeta oscuras, mayor es el tiempo de fermentación. Es

importante controlar el tiempo de fermentación ya que al aumentar los días de fermentación se provoca una acidez excesiva, consecuentemente baja calidad sensorial (Sinche Bosquez, 2013).

La temperatura, a los inicios de la fermentación se alcanzan temperaturas entre los 45 - 50 °C, luego esta desciende y nuevamente aumenta en el segundo volteo de los granos, llegando finalmente a subir a 48 - 50 °C, luego disminuye al finalizar la fermentación. El embrión muere cuando la temperatura interna del grano llega a los 45 °C, también por efecto del pH, este desciende por presencia de ácido acético, el cual se difunde por la testa. La temperatura de fermentación puede afectar significativamente la degradación de compuestos polifenoles en los granos de cacao, a menor temperatura reduce la degradación de polifenoles.

El pH de la fermentación, el valor de este en el mucílago está entre 3.3 y 4.0 por a la presencia de ácido crítico (Ramos, 2019). A medida que la masa se coloca en los cajones de fermentación, se observa una disminución en el pH, descendiendo desde alrededor de 6.5 en los granos frescos hasta valores que oscilan entre 5 y 5.5 en las almendras fermentadas. Por otro lado, según (Neira et al., 2020) las almendras de cacao correctamente fermentadas tienen un pH entre 5.20 - 5.25, y la testa de 5.1 - 5.5.

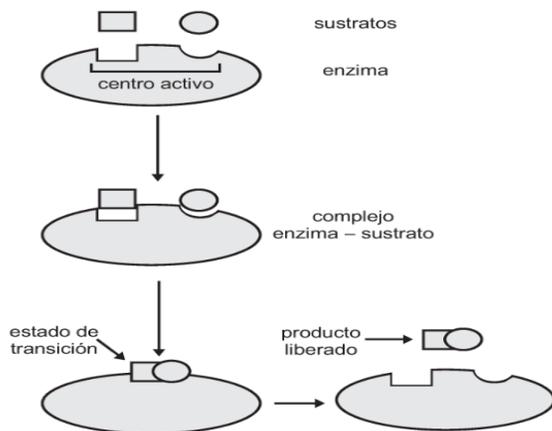
La frecuencia de remoción, durante las primeras 36 horas las almendras no deben ser removidas, ya que es el tiempo que dura la fase de fermentación anaeróbica; luego, es necesario voltear la masa cada 24 horas, para permitir la liberación del CO₂ (Ramos, 2019). En cambio, una opción adicional sería comenzar el volteo a las 48 horas desde el inicio de la fermentación, y después realizarlo cada 24 horas, siempre en el mismo horario.

1.3 Enzimas

Son moléculas de naturaleza proteica que controlan el mecanismo de la reacción y la velocidad a la que se aproxima al equilibrio, es decir, son catalizadores en sistemas biológicos. Poseen elevado grado de especificidad respecto a su sustrato, donde tienen la finalidad de acelerar las reacciones químicas y no forman subproductos durante el proceso, además actúan sobre soluciones acuosas a temperatura y pH no muy elevados (Melo & Cuamatzi, 2019).

Figura 5

Formación del complejo enzima-sustrato



Tomado de: (Melo & Cuamatzi, 2019)

La función catalizadora de las enzimas permite acelerar considerablemente las reacciones que se desarrollan en condiciones naturales. Es así que el uso de enzimas por su especificidad aporta a simplificar y tener control de calidad estricto de los procesos (Martínez et al., 2011).

1.3.1 *Enzima Pectinolítica*

Las pectinasas, presentes en frutas, vegetales y microorganismos, poseen diversas aplicaciones en la industria alimentaria. Entre estas aplicaciones se incluyen la clarificación de vinos y jugos, así como el aumento del rendimiento de diversos procesos. Este grupo de enzimas

abarca la poligalacturonasa, pectinesterasa, pectinoliase y pectatoliasa, las cuales catalizan la degradación de sustancias pécticas a través de diferentes tipos de enlaces. Estas enzimas son capaces de descomponer las cadenas homogalacturónicas de las pectinas, siendo responsables de la degradación de la cadena principal de estas moléculas (Otárola, 2018). Por lo general tienen un pH óptimo entre 3 - 6 las de origen fúngico y entre 5-8 las de origen bacteriano (Cruz, 2013).

La enzima pectinasa destruye los enlaces 1,4-a-D-galacturónicos de la pectina. La pectina es un heteropolisacárido componente estructural de diversas frutas y verduras que al solubilizarse parcialmente en el proceso provoca que se deteriore el aspecto y haya efectos negativos en la floculación y/o capacidad de filtración del jugo, esto desembocaría en una reducción del rendimiento (Avilés & Tapia, 2016).

La acción de las enzimas pectinolíticas en la descomposición de la pectina presente en la pulpa provoca un aumento en la permeabilidad de los granos, permitiendo la conexión entre las reacciones que ocurren en la superficie externa del grano con las que se desarrollan en su interior, por lo tanto la acción de estas enzimas tiene un impacto significativo en la fermentación de cacao (Ouattara et al., 2017).

1.4 La Naranja

La naranja, cuyo nombre científico es *Citrus sinensis*, es un fruto esférico con un elevado contenido de jugo. Sus características, como tamaño, dulzura y color, varían según la especie de naranja cultivada. En Ecuador, se encuentran diversas variedades de naranjas dulces, entre las que se destacan la Valencia, Navel y Parson Brown. Además, posee alto contenido de vitaminas, fibras y minerales que hacen que esta sea una de las frutas más consumidas a nivel mundial (García &

Lozano, 2021). El fruto es de tamaño medio a grande, esférico o ligeramente alargado, de color intenso algo pálido y de corteza espesa pero fina (Campelo, 2020).

1.4.1 Cáscara de Naranja

Son residuos agroindustriales derivados de la elaboración de jugos y representan el 50 % del peso total de la fruta (García & Lozano, 2021). La cáscara de naranja tiene un 80.8% de carbohidratos, estos son pectinas del 30-50%, azúcares (sacarosa, fructosa, glucosa), hemicelulosa, del 10-20% y celulosa del 20-40% (Avilés & Tapia, 2016). La tabla 6 detalla la composición fisicoquímica de la cáscara de naranja.

Tabla 6

Composición fisicoquímico de la cáscara de naranja

	Materia seca	90
	Proteína	6
Componentes principales (%)	Carbohidratos	62.70
	Grasas	3.40
	Fibra	13
	Cenizas	6.90
	Minerales (%)	Calcio
	Magnesio	0.16
	Fósforo	0.10
	Potasio	0.62
	Azufre	0.06
Vitaminas (mg/kg)	Colina	770
	Niacina	22
	Ácido	14.96
	Pantoténico	
	Riboflavina	22.20

Tomado de: (Avilés & Tapia, 2016)

1.5 Azúcares Reductores

Los azúcares reductores se obtienen mediante procesos de desdoblamiento del material celulósico de la biomasa en azúcares simples que sean asimilables por los microorganismos en un proceso de fermentación. Los monómeros que se obtienen con la degradación del polímero son fructosa, galactosa, xilosa y glucosa. Los procesos pueden ser individuales o simultáneos, que van desde hidrólisis ácida, hidrólisis enzimática e hidrólisis y fermentación. Para el caso de la harina de cáscara de naranja el mejor proceso en la degradación de la celulosa y hemicelulosa ha resultado la hidrólisis ácida (Ayala et al., 2021).

1.5.1 Determinación de Azúcares Reductores (prueba DNS)

Se llevará a cabo la toma de muestras de cada tratamiento, requiriendo el filtrado de la muestra, seguido de la adición de 5 ml de HCl y el calentamiento a baño maría (65°C) durante 10 minutos. Después, se dejará enfriar la muestra y se neutralizará con NaOH al 10% (peso/volumen). En etapas subsiguientes, se pesarán 5 g de ácido 3,5-dinitrosalicílico, 150 g de tartrato de Na-K y 8 g de NaOH. El NaOH se disolverá en 200 ml de agua destilada y se añadirá lentamente el tartrato de Na-K con agitación. La solución se completará con agua destilada hasta alcanzar 400 ml y luego se agregará gradualmente el ácido 3,5-dinitrosalicílico. Tras dejar en agitación durante toda la noche, se enrasará a 500 ml y finalmente se filtrará. Se emplearán tubos de cristal de 10 ml para añadir 0.5 ml de muestra y 0.5 ml del reactivo de DNS. Estos tubos se colocarán en un baño maría a 100 °C durante 5 minutos. Después de enfriar a temperatura ambiente, se agregarán 5 ml de agua destilada, se agitarán y se realizará la lectura a 540 nm en un espectrofotómetro. Posteriormente, se procederá a la representación de la curva. (Bello Gil et al., 2015).

1.6 Índice de Fermentación (IF)

El índice de fermentación (IF) está relacionado con el cambio de color de los granos de cacao, al inicio de la fermentación presentan un color violeta fuerte por el contenido de polifenoles, y cambian a color marrón debido a la condensación de antocianinas, aumentando el valor de absorbancia a 460 nm. Valores de IF superior a uno indica granos bien fermentados, mientras que un valor inferior a 1 indica fermentación insuficiente (Hernández et al., 2019). Las longitudes de onda seleccionadas, 530 nm y 460 nm, son utilizadas para caracterizar propiedades estructurales y distribuciones durante la fermentación. La selección de estas longitudes de onda se debe a que 530 nm es para espectros de antocianina, y 460 nm refleja la distribución de glucósidos (Racine et al., 2019).

1.6.1 Determinación del Índice de Fermentación

Tras la eliminación de la cáscara, los granos se someten a molienda y tamizado. La muestra se desengrasa utilizando éter de petróleo, seguido de una extracción de los componentes con una solución de ácido clorhídrico en metanol. En este extracto, se evalúa la Absorbancia a 460 y 530 nm mediante un espectrofotómetro UV-VIS. Se establece el índice de fermentación calculando la relación DO460/DO530. Los resultados de índice de fermentación de las almendras de cacao pueden expresarse según la solución de la ecuación 1:

$$IF = A460/B530 \quad (1)$$

IF = Índice de Fermentación

A460 = Absorbancia a 460 nm

B530 = Absorbancia a 530 nm

Los valores encontrados pueden ponerse en una escala correspondiente a diferentes grados de fermentación como se muestra en la tabla 7.

Tabla 7

Escala para determinar el índice de fermentación del cacao

Índice de fermentación	Grado de fermentación
IF<1	Fermentación insuficiente
1<IF<1.2	Fermentación correcta
IF>1.2	Sobre fermentado

Tomado de: (Teneda Llerena, 2017)

CAPÍTULO II

METODOLOGÍA

2.1 Caracterización del área de estudio

El híbrido CCN51 se obtuvo de una finca ubicada en la parroquia Selva Alegre ubicada, cantón Otavalo. El desarrollo experimental de la investigación se realizó en la ciudad de Ibarra. Este proceso se llevó a cabo en los laboratorios de Análisis fisicoquímicos e instalaciones de las Unidades Edu productivas que se encuentran a disposición de la Facultad de Ingeniería en Ciencias Agropecuarias y Ambientales (FICAYA) de la Universidad Técnica del Norte. En la tabla 8 se describen las características del área de estudio.

Tabla 8

Localización del experimento

Localización	Unidades Edu Productivas
Provincia	Imbabura
Cantón	Ibarra
Parroquia	El Sagrario
Altitud	2225 msnm
Humedad Relativa	62%
Temperatura media	17 ° C
Latitud	78° 34' 24''
Pluviosidad	503-1000 mm Año

Tomado de: Gobierno Autónomo Descentralizado Municipal San Miguel de Ibarra

2.2 Materiales y Equipos

Para llevar a cabo el trabajo de investigación y cumplir con los objetivos propuestos se requirió diferentes materiales, instrumentos, insumos y equipos.

2.2.1 *Materiales*

- Bolsas de polietileno
- Recipiente plástico (2500 ml)
- Papel filtro Whatman N°4, diámetro 12.5 mm
- Balón volumétrico (1000, 50, 25 ml)
- Matraz Erlenmeyer (125 ml)
- Probeta (100, 250 ml)
- Tubos de ensayo (10 y 15 ml)
- Pipeta volumétrica (5 ml); (Ap. ± 0.05 ml)
- Pipeta volumétrica (10 ml); (Ap. ± 0.1 ml)
- Embudos de vidrio para filtración 12 cm de diámetro
- Micropipeta automática de 100 a 1000 uL
- Puntas para micropipeta automática
- Tamiz de 0,5 mm de tamaño de partícula
- Cajas Petri 100 y 150 mm de diámetro

2.2.2 *Equipos*

- Balanza analítica (Ap.= ± 0.01 g)
- Potenciómetro (Marca Hanna)
- Baño maría

- Agitador mecánico
- Espectrofotómetro (Marca Jenway)
- Desecador con silica gel como material desecante
- Mufla
- Estufa
- Refrigerador
- Calibrador digital

2.2.3 *Insumos*

- Cacao híbrido CCN51
- Residuos de naranja

2.2.4 *Reactivos*

- Metanol grado reactivo al 99.5% (CH₃OH)
- Agua destilada
- Ácido Clorhídrico fumante 36.5-38%, densidad 1.19 (HCl)
- Reactivo DNS
- Buffer pH 4 y 7

2.3 **Métodos**

En el proceso de fermentación de las semillas de cacao se evaluaron variables como pH, temperatura (°C) e índice de fermentación; para tal fin se detallan a continuación los métodos a utilizados.

2.3.1 Estandarización de los Residuos de Cítricos

En primera instancia se realizó la estandarización de los residuos de la naranja (**Anexo I**) en ánimo de tener un punto de inicio de uno de los componentes del sustrato a utilizar durante el proceso de fermentación, donde las variables de interés son el contenido de humedad (método de secado) y la actividad enzimática de las pectinasas (medición de azúcares reductores por la prueba DNS) de los residuos de la naranja. Así también se realizó caracterización fisicoquímica (pH, humedad, cenizas y materia seca). En la tabla 9 se describen los métodos utilizados para los análisis fisicoquímicos y actividad enzimática.

Tabla 9

Variables cuantitativas para análisis fisicoquímico

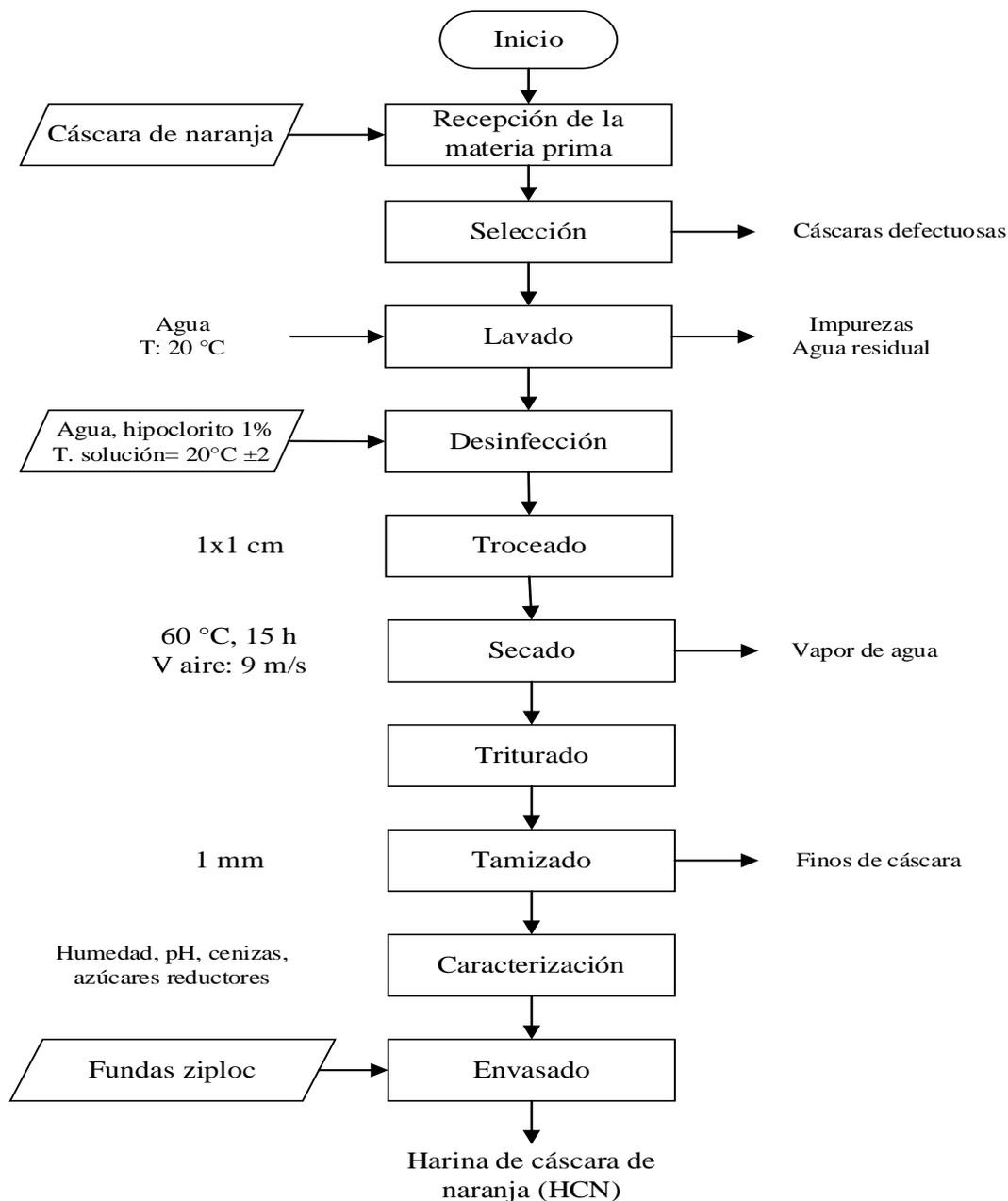
Análisis	Método	Unidades	Referencia
Secado	Deshidratación	%	(Torres-Valenzuela et al., 2019)
pH	Potenciómetro	Adimensional	(NTE INEN 0381)
Cenizas	Cenizas totales	%	(NTE INEN 0401)
Humedad	Estufa	%	(NTE INEN 1513)
Actividad enzimática	DNS	g/ml	(Bello Gil et al., 2015)

Tomado de: Autor

El diagrama de proceso de acondicionamiento de cáscara de naranja y caracterización fisicoquímica se muestra en la figura 6.

Figura 6

Diagrama de proceso para la cáscara de naranja



Tomado de: Autor

Descripción del proceso de acondicionamiento de cáscara de naranja:

- **Recepción y selección de materia prima:** Se adquirieron alrededor de 20 kg de cáscara de naranja en estado de madurez comercial de los expendedores de jugo en el mercado Santo domingo de Ibarra. Mediante observación visual se seleccionaron (daños físicos y microbiológicos) y depositaron las cáscaras en fundas de polietileno.
- **Lavado y desinfección:** Se lavaron las cáscaras para retirar impurezas y la pulpa, aplicando agua a temperatura ambiente para realizar un lavado constante de 2 a 3 minutos (Chávez Arias, 2023). Posteriormente se sumergió las cáscaras en una solución desinfectante de agua con hipoclorito de sodio, dejando en reposo durante 5 min y finalmente un segundo lavado.
- **Troceado:** Con la ayuda de un cuchillo se trocearon las cáscaras en tamaños aproximados de 1x1 cm, con la finalidad de tener mayor contacto de partícula durante el secado.
- **Secado:** El proceso se llevó a cabo mediante el uso de un secador de bandejas configurado para operar a una temperatura de 60 °C durante 15 horas, con una velocidad de aire de 9 m/s, con el propósito de facilitar la etapa de trituración. El secado se ejecutó con la intención de establecer un punto inicial para la materia prima en términos de humedad y, al mismo tiempo, preservarla.
- **Triturado y tamizado:** Con la ayuda de un molino de martillos se trituró la cáscara de naranja y a través de un tamiz se homogenizó el tamaño de las partículas, con el fin de garantizar un mayor contacto de partícula con el mucílago de las semillas de cacao, se manejó un tamaño de 1 mm aproximadamente.
- **Caracterización:** Se realizó los análisis fisicoquímicos (pH, humedad, materia seca, actividad enzimática y cenizas) con el fin de estandarizar la materia prima.

- **Envasado:** Se empacó la harina de cáscara de naranja en fundas ziploc, fueron selladas y almacenadas en contenedores de espuma (poliestireno expandido – Tecnopor).
- **Medición DNS:** Es un método colorimétrico que al hacerlo reaccionar con el ácido 3.5 Dinitrosalicílico permite medir los azúcares reductores de una muestra. Para determinar la actividad enzimática de la harina de cáscara de naranja se realizó una curva de calibración para la glucosa (**Anexo V**) para así estimar los valores de las muestras.

2.3.2 Determinación de las Proporciones de Mezcla de Cáscara de Naranja y Granos de Cacao en el Proceso de Fermentación.

Para la fase experimental de la fermentación se utilizó semillas de cacao con mucílago (0.85 kg por tratamiento) y harina de cáscara de naranja en diferentes concentraciones la cual se obtuvo del proceso de estandarización de los residuos de este cítrico. Las semillas fueron extraídas de mazorcas variedad CCN51 en estado de madurez etapa 2 y 3 según lo reporta (Hernández et al., 2019).

2.3.2.1 Diseño experimental y factores de estudio

El experimento constó de dos factores con uno y tres niveles cada uno, con dos repeticiones. En la tabla 10 se describen los factores a evaluarse, los cuales fueron la cantidad de harina de cáscara de naranja [A] en diferentes concentraciones y el porcentaje en base a 0.85 kg de cacao [B] para cada unidad experimental.

Tabla 10*Factores para el diseño experimental*

Factor	Nomenclatura	Concentración (%)	Cantidad (g)
Factor A	C1	0	0
	C2	2	17
	C3	4	34
	C4	6	51
Factor B	S	100	850

Tomado de: Autor

2.3.2.2 Características del experimento

El experimento constó de 4 tratamientos con 2 repeticiones, resultando un total de 8 unidades experimentales, para las cuales se utilizaron recipientes plásticos de alta densidad con capacidad de 2500 ml.

2.3.2.3 Tratamientos

Los tratamientos y la interacción de los mismos que se investigaron se describen en la tabla 11 con su respectiva codificación y repeticiones.

Tabla 11*Descripción de tratamientos en estudio*

Tratamientos	A	B	Interacciones	Repeticiones
T1	C1	S	C1S	T1R1
				T1R2
T2	C2	S	C2S	T2R1
				T2R2

T3	C3	S	C3S	T3R1 T3R2
T4	C4	S	C4S	T4R1 T4R2

Tomado de: Autor

2.3.2.4 Descripción del experimento

Se pesó 0.85 kg de semillas de cacao con mucílago, según metodología de (Rojas-Rojas et al., 2021) dónde se utilizó una cantidad similar, así también las diferentes cantidades de harina de cáscara de naranja para iniciar el proceso de fermentación en estado sólido (SSF, por sus siglas en inglés), el cual consistió en introducir las semillas de cacao con mucílago dentro del recipiente plástico el cual consta de perforaciones de 4 mm en su base para escurrir el mucílago.

2.3.2.5 Análisis Físicoquímico de las variables a evaluar

En la tabla 12 se describen las variables evaluadas en cada tratamiento y los métodos a seguir, se hizo uso del laboratorio de Análisis físicoquímico y microbiológico de la Universidad Técnica del Norte. Se obtuvieron de 5 a 7 semillas de la muestra central de la masa de cacao de manera aséptica cada 24 h, desde el día uno hasta llegar a las 144 horas de fermentación, con el propósito de realizar análisis físicoquímicos (Racine et al., 2019); (Hernández et al., 2019).

Tabla 12

Métodos utilizados para la determinación de variables de investigación

Análisis	Método	Referencia
pH	Potenciómetro	(Hernández et al., 2019)
Índice de fermentación	IOCCC N° 40	(Teneda Llerena, 2017)

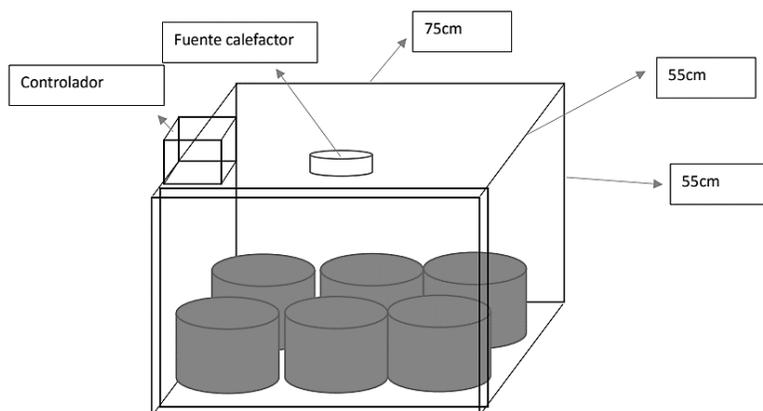
Tomado de: Autor

2.3.2.6 Temperatura

Para simular las condiciones de temperatura observadas en el campo se utilizó 2 birreactores (55x55x75 cm) con aislante interno en las paredes (poliestireno expandido) donde se introdujeron 6 unidades experimentales en cada uno. Los rangos de temperatura fueron las siguientes: 25 °C (0–24 h), 35 °C (24–48 h), 40 °C (48–72 h), 45 °C (72–96 h) y 48 °C (96-144 h) según lo descrito en el experimento realizado por (Lee et al., 2019). En la figura 7 se muestra el esquema del biorreactor a utilizar.

Figura 7

Esquema del reactor utilizado en la fermentación



Tomado de: Autor

2.3.3 Optimización de la Proporción de Mezcla en el Proceso de Fermentación

Se buscó optimizar la cantidad de harina de cáscara de naranja con el fin de estimar la cantidad necesaria sólo para cubrir la superficie de las semillas de cacao. Para determinar el volumen (ecuación 2) y área superficial (ecuación 3) de semilla se basó en la metodología de (Becerra et al., 2022) con modificaciones, se asumió que la semillas de cacao son de forma

elipsoidal, donde se determinó la longitud del eje mayor $2R$, eje menor $2r$, y espesor x de 80 semillas.

$$V = 4/3\pi abc \quad (2)$$

Y para el área superficial:

$$S \approx 4\pi[(a^p b^p + a^p c^p + b^p c^p)/3]^{1/p} \quad (3)$$

Donde,

$$p = 1.6075$$

a = radio a lo largo del eje $2R$ (cm)

b = radio a lo largo del eje $2r$ (cm)

c = radio a lo largo del eje x (cm)

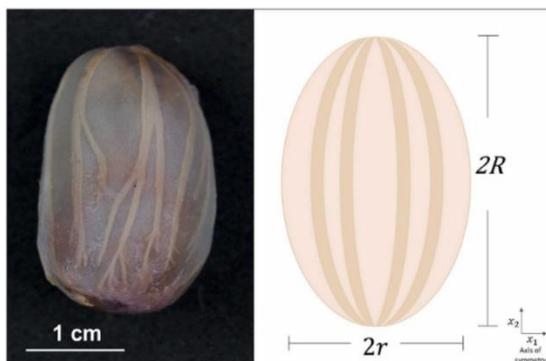
V = volumen de la semilla (cm^3)

S = área superficial de la semilla (cm^2)

La figura 8 presenta una representación esquemática de semilla de cacao en cuanto a los ejes para sus dimensiones, aunque no se muestra el eje del grosor, este también fue tomado en cuenta para calcular el volumen y área superficial.

Figura 8

Representación geométrica de las semillas de cacao



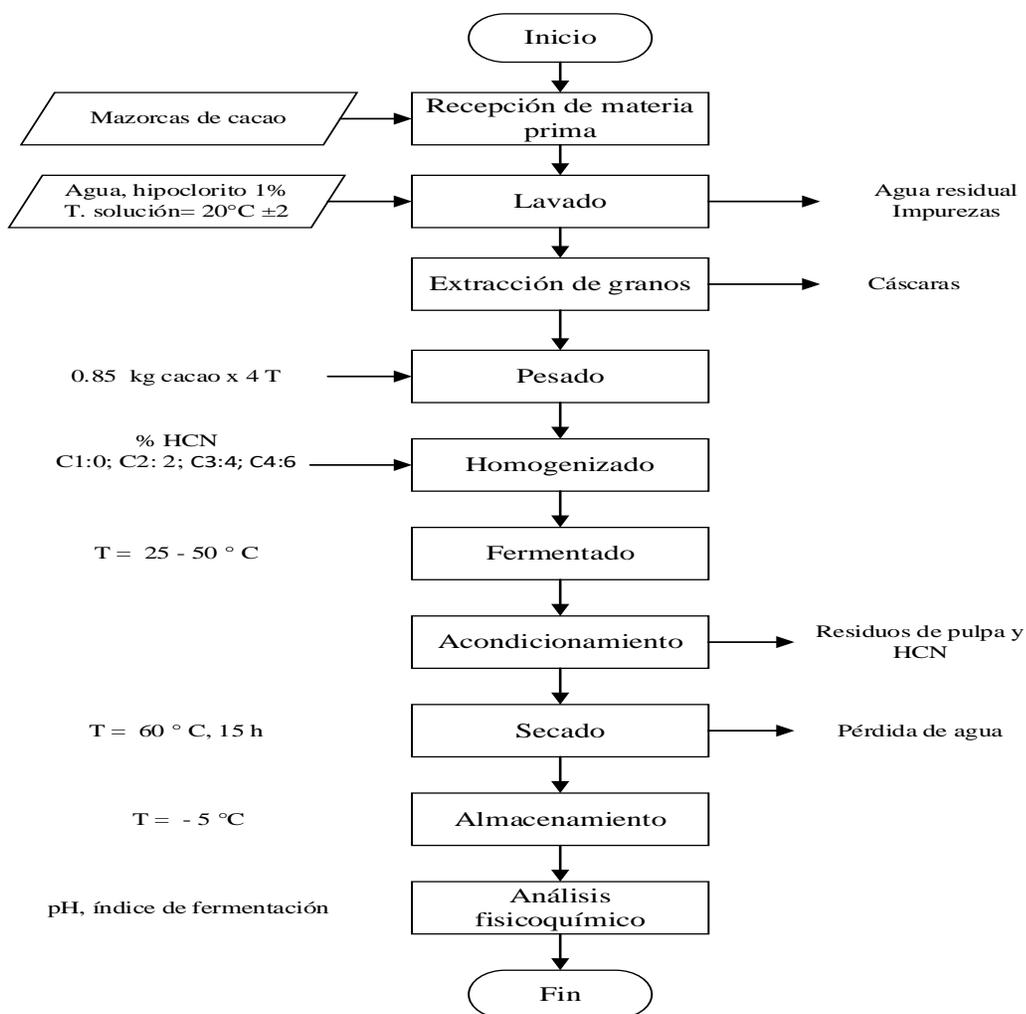
Tomado de: (Becerra et al., 2022)

2.4 Manejo Específico del Experimento

Para la fase experimental de la fermentación se aplicó un diagrama de proceso de las actividades a realizar. En la figura 9 se expone el diagrama de proceso de la fermentación de los granos de cacao.

Figura 9

Diagrama de proceso de la fermentación



Tomado de: Autor

2.4.1 Descripción del Proceso de la Fermentación de los Granos de Cacao

Con la finalidad de establecer la secuencia de pasos lógicos para el proceso de fermentación de los granos de cacao (**Anexo II**), se plantea lo siguiente:

- **Recepción y selección:** Se receptaron mazorcas de cacao en aproximadamente dos estadios de madurez considerando días después de anthesis (DDA), etapa 2 (30-152 DAA, con un color vino tinto y pintas verdes y amarillas) y etapa 3 (153-174 DDA, color completamente rojo) (Hernández et al., 2019), provenientes de una finca cacaotera de la zona de Intag, parroquia Selva Alegre; además se realizó una inspección visual de las mazorcas para controlar que no existan daños mecánicos o presencia de algún tipo de material extraño.
- **Lavado de vainas:** Las vainas o mazorcas fueron lavadas con una solución de hipoclorito al 1% y luego se extrajeron las semillas.
- **Extracción de semillas:** Se realizaron cortes transversales de las mazorcas para extraer las semillas sin placenta.
- **Pesado:** en una balanza marca CAMRY (Cap. 5000 g. $A_p = \pm 1$ g) se pesaron 0.85 kg de cacao para cada tratamiento y se depositaron en las unidades experimentales.
- **Homogenizado:** Se añadieron las semillas en recipientes plásticos las muestras de 0.85 kg de cacao más las respectivas cantidades de harina de cáscara de naranja y con la ayuda de una paleta se homogenizo la mezcla durante 2 min.
- **Fermentación:** Se inició la fermentación en un sistema cerrado para las condiciones anaerobias (primeras 48 h), posteriormente la fase aerobia y remociones cada 24 h hasta terminar la fermentación (144 h). Para los análisis de pH e índice de fermentación de las almendras se obtuvieron asépticamente de 5 a 7 semillas al azar de la masa de cacao cada 24 horas y se congelaron, desde la hora uno hasta el final de la fermentación (día 6).

- **Acondicionamiento:** Para el análisis fisicoquímico se retiró la pulpa del grano seguido de un triturado y luego un proceso de secado por estufa a 60 °C por 15 h para alcanzar una humedad de almacenamiento lo cual depende del método de secado ya que en un estudio realizado por (Atiaga & Tarco, 2022) sobre la cinética de secado del híbrido CCN51 se alcanzó una humedad de 5.5% m/m, partiendo de humedad inicial de 46.4 %. Sin embargo, en este estudio a esas condiciones de temperatura se alcanzó una humedad alrededor del 15 % m/m de un valor inicial del 38 % (m/m).
- **Almacenamiento:** Las muestras trituradas se almacenaron en fundas ziploc y se mantuvieron en congelación a -5 °C.
- **Análisis fisicoquímico:** Se realizó el análisis de pH (**Anexo III**) e índice de fermentación (**Anexo IV**) siguiendo la metodología para cada análisis, descritos en la tabla 12, con modificaciones para el segundo análisis en cuanto a la temperatura de refrigeración de la muestra en reposo que fue de 5 °C.

CAPÍTULO III

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 Estandarización de los residuos de cítricos

A partir de las muestras de cáscara de naranja y completados los procesos de conservación correspondientes, se procedió a realizar los análisis fisicoquímicos necesarios para obtener información de componente fisicoquímicos del sustrato antes de iniciar el proceso de fermentación del cacao. De esta manera, se garantiza que todos los experimentos se llevaran a cabo en condiciones iniciales similares.

3.1.1 Análisis Fisicoquímicos

En la tabla 13 se describen los análisis fisicoquímicos realizados a la harina de cáscara de naranja.

Tabla 13

Análisis fisicoquímicos de la harina de cáscara de naranja

	pH Adimensional	Humedad %	Cenizas %	Azucares reductores mg/ml
Promedio	4.86 ± 0.05	8.17 ± 0.74	4.02 ± 0.03	0.59 ± 0.17

*Promedio \pm desviación estándar

3.1.1.1 pH

El valor obtenido fue de 4.86 ± 0.05 el cual entra en la escala de ligeramente ácido, valor algo cercano al reportado por (Angulo Arias et al., 2018) que fue 4.43 ± 0.02 sin embargo podría considerarse un valor alto ya que el pH característico de los cítricos se encuentra entre 3.4 y 4.

Sin embargo se considera un valor favorable para la fermentación de los granos de cacao ya que el pH inicial del medio es ácido es decir de la pulpa, con valores entre 3.3 a 4.0.

3.1.1.2 Humedad

La humedad de la HRN después de la etapa de secado fue de $8.17 \pm 0,74\%$ valor que se considera adecuado para su almacenamiento a temperatura ambiente lo cual evita el crecimiento microbiano este valor es cercano a los reportados por (Guerra Baños et al., 2020). El resultado se encuentra dentro de los parámetros indicados por las normas para harina de trigo, ya que de acuerdo con la norma ecuatoriana (INEN, 2015), se recomienda una humedad por debajo de 14.5 %. Sin embargo (Angulo Arias et al., 2018) encontró un valor superior 11.33%, estos resultados pueden atribuirse a los métodos y condiciones de secado y almacenamiento.

3.1.1.3 Cenizas

En el estudio de (Angulo Arias et al., 2018), se investigaron las condiciones de secado de la cáscara de naranja a una temperatura de $65\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 72 horas. Durante este proceso, se determinó un contenido de cenizas aproximado del 3.35%, valores similares obtuvieron (El-Beltagi et al., 2022), quienes reportaron un $3.00 \pm 0.20\%$ de cenizas. En comparación con los estudios mencionados en el sustrato analizado se encontró un valor de cenizas superior ($4.02\% \pm 0.03$). Así también (Romelle et al., 2016) obtuvieron valores elevados de cenizas 5.17 ± 0.98 en la variedad navel. Por otro lado, en el estudio de (Chávez Arias, 2023) se menciona que niveles superiores al 18% de cenizas generan toxicidad del sustrato lo cual evita el desarrollo de macroorganismos.

3.1.1.4 Azúcares Reductores

Se observó una cantidad de azúcares reductores de 20.23 ± 0.20 g/L en el sustrato. Este valor resultó ser inferior a los reportados por (Ayala et al., 2021); (Ricci et al., 2023), quienes afirmaron que después de una hidrólisis se obtuvieron altos valores de azúcares reductores en la harina de cáscara de naranja, con 24.59 g/L y 24.4 g/L respectivamente, especialmente para la glucosa. Sin embargo, fue superior a los valores obtenidos por (Almowallad et al., 2022) en su estudio de caracterización del sustrato, donde se encontraron valores de $17.8 \pm 1.20\%$ (m/m). Las concentraciones de glucosa y fructosa pueden variar en los experimentos debido a la composición de los residuos de cáscara de naranja, la cual está influenciada por la posición geográfica, el tipo de suelo y las condiciones climáticas (Ayala et al., 2021).

Por otro lado, se encontró que según (Chávez Arias, 2023), para transformar la concentración de azúcares reductores a unidades de actividad enzimática, se utiliza un factor de conversión donde 1 mg de glucosa liberada equivale a 0.185 UI/ml. Utilizando este factor de conversión, se determinó que el sustrato presentaba una actividad enzimática de aproximadamente 3.74 ± 0.04 UI/ml.

Estos resultados indican que, aunque la cantidad de azúcares reductores en el sustrato fue menor que en otros estudios previos, aún se observa una actividad enzimática significativa. Esto sugiere la presencia de enzimas capaces de hidrolizar los azúcares reductores presentes en el sustrato utilizado. Sin embargo, se requieren estudios adicionales para comprender mejor la composición y la actividad enzimática en este sustrato específico.

3.2 Determinación de las Proporciones de Mezcla de Cáscara de Naranja y Granos de Cacao en el Proceso de Fermentación.

3.2.1 pH

Los valores de pH representados en la tabla 14 no muestran variabilidad entre los tratamientos, y se encuentran fuera de la escala de ácido. Respecto a la desviación estándar, esta fue relativamente baja, siendo de 0.21 el mayor valor y en algunos casos nula por lo tanto es un indicador relevante de la consistencia de los resultados obtenidos para pH. Sin embargo son similares a los reportados por (Alvarez et al., 2010) donde uno de sus fermentadores fueron cestas plásticas rectangulares y obtuvieron un pH promedio de 5.59. Por otro lado (Sanchez et al., 2019) afirman que el tipo de fermentador afecta significativamente al pH del cotiledón, en su fermentación usando cajas tipo Rohan obtuvieron un valor de pH de 5.61, el cual es mucho más cercano a los obtenidos en este estudio y por lo que podría explicarse la razón de variabilidad.

Tabla 14

Valores de pH del grano de cacao

pH del grano de cacao				
Tiempo (días)	T1 (testigo)	T2	T3	T4
1	6.35 ± 0.21	6.45 ± 0.07	6.45 ± 0.07	6.60 ± 0.00
2	6.35 ± 0.07	6.40 ± 0.00	6.45 ± 0.07	6.50 ± 0.00
3	6.10 ± 0.00	6.20 ± 0.00	6.20 ± 0.00	6.20 ± 0.00
4	6.05 ± 0.21	6.15 ± 0.07	6.20 ± 0.14	6.10 ± 0.14
5	5.95 ± 0.21	5.90 ± 0.00	5.95 ± 0.21	5.75 ± 0.21
6	5.75 ± 0.21	5.70 ± 0.00	5.75 ± 0.35	5.65 ± 0.07

*Promedio ± desviación estándar

En el estudio sobre la calidad sensorial de las semillas de cacao fermentadas y secas realizado por (Santander Muñoz et al., 2020), se destaca que se logran resultados favorables en términos de sabor cuando se lleva a cabo una fermentación con una ligera acidificación en un rango de pH de 5.0 a 5.5. Esto se debe a que, durante este proceso, la degradación de proteínas ocurre selectivamente, resultando en niveles elevados de aminoácidos hidrófobos y péptidos hidrofílicos. Por otro lado según (Parra Rosero, 2018) un pH con altos estándares de calidad (pH 5.1 a 5.4) se logra con un exitoso proceso de secado donde influyen parámetros como la temperatura y tecnología de aplicada. Sin embargo, (Teye et al., 2015) mencionan que un rango de pH de 5 – 6 se considera bueno para precursores de sabor de calidad del chocolate, se diría que los valores obtenidos en el estudio son correctos.

3.2.2 Índice de Fermentación (IF)

En el presente estudio, se determinó el índice de fermentación en relación con el color de los granos de cacao posterior a la fermentación. A través de espectrofotometría se realizaron comparaciones entre los niveles de flavonoides complejos, asociados con tonalidades marrones, y los niveles de antocianinas, responsables del color púrpura en los granos secos de cacao. Los resultados indicaron una relación directamente proporcional entre el índice de fermentación y la concentración de los mencionados compuestos (Horta-Téllez et al., 2019). Además, se observó que, según lo señalado por (Tamimi et al., 2023), estos compuestos alcanzan su máxima absorbancia a diferentes longitudes de onda: 460 nm para los flavonoides complejos y 530 nm para las antocianinas. Los valores de absorbancias para cada tratamiento se muestran en el **Anexo VI**.

Las mazorcas del híbrido CCN51 fueron cosechadas y se almacenaron durante 32 h antes de la fermentación, por tal razón se presume haber observado un índice de alrededor de 0.55, este

aumento podría atribuirse al tiempo de almacenamiento ya que según (Hinne et al., 2018) en los granos de cacao, se producen una serie de transformaciones físicas y bioquímicas, que abarcan desde la evaporación del agua, la conversión de sacarosa, las variaciones en la acidez hasta las alteraciones de las sustancias fenólicas. En la tabla 15 se observa que T2 (2% m/m de HRN) fue el primero en alcanzar un índice de fermentación aceptable, siendo este de 1.05, seguido de T4 (0.98; con 6% m/m de HRN) que es el que se encuentra más próximo a un IF adecuado en los 5 días. El valor de IF alcanzado se encuentra dentro del rango de IF según lo mencionado por (Teneda Llerena, 2017) donde establece que es una buena fermentación cuando esta variable está en un intervalo de 1 – 1.2.

Tabla 15

Índice de fermentación del cacao en los diferentes tratamientos

ÍNDICE DE FERMENTACIÓN				
Tiempo (días)	T1 (testigo)	T2	T3	T4
1	0.53 ± 0.02	0.56 ± 0.05	0.54 ± 0.02	0.55 ± 0.04
2	0.55 ± 0.06	0.53 ± 0.01	0.52 ± 0.04	0.55 ± 0.01
3	0.63 ± 0.05	0.58 ± 0.04	0.57 ± 0.03	0.59 ± 0.02
4	0.75 ± 0.10	0.71 ± 0.01	0.72 ± 0.03	0.77 ± 0.02
5	0.88 ± 0.17	1.05 ± 0.16	0.95 ± 0.04	0.98 ± 0.04
6	0.92 ± 0.15	1.06 ± 0.04	1.02 ± 0.01	1.06 ± 0.12

*Promedio ± desviación estándar

En comparación con lo reportado por (Hernández et al., 2019) donde obtuvieron un índice de fermentación de 1.35 ± 0.01 a los 7 días de fermentación en la etapa 2 de madurez de la mazorca, se diría que tardó más tiempo en alcanzar un IF correcto en relación al obtenido en este estudio.

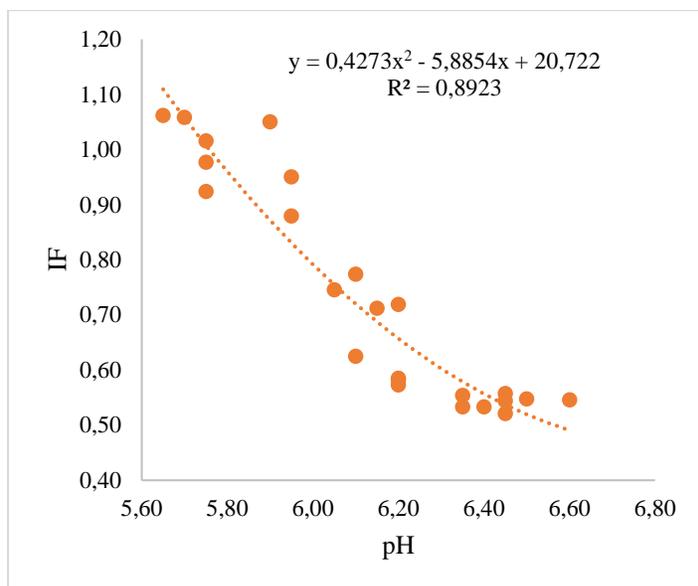
Por otro lado, (Murillo & Soria, 2023) afirman que el tiempo de fermentación del CCN51 dura de 6 a 7 días, sin embargo en este estudio el testigo no alcanzó un valor óptimo de fermentación a este tiempo, a diferencia del tratamiento 2 que fue el más óptimo a los 5 días.

3.2.3 Relación del pH Respecto al Índice de Fermentación

El índice de fermentación y el pH son variables importantes de verificar durante la fermentación de los granos de cacao ya que son parámetros que determinan la calidad de los mismos. La figura 10 representa la relación de las dos variables de estudio, se observa que el pH es inversamente proporcional al índice de fermentación, por otro lado, se eligió como modelo matemático un polinomio de segundo grado ya que fue el que mostró la mejor correlación de los datos obteniéndose un R cuadrado de 0.89, sin embargo similar al comportamiento de los datos reportados por (Hernández et al., 2019), aunque se obtuvo un índice de fermentación superior a 1 (T2) y muy cercanos a este en los demás tratamientos respecto al testigo, el pH no alcanzó el rango que se establece como de calidad que es 5.1 a 5.4 como se mencionó anteriormente.

Figura 10

Relación del pH respecto al índice de fermentación (IF)



Tomado de: Autor

3.2.4 Cinética de la Fermentación

A través del uso del software CurveExpert Basic y la aplicación de un modelo exponencial al tiempo experimental e índice de fermentación, se pudo observar que la cáscara de naranja ejerce influencia en los diferentes tratamientos en cuanto a reducir el tiempo de fermentación que se predijo utilizando el método integral según lo menciona (Zúñiga-García et al., 2020), adaptado a las variables de estudio (ecuación 4) y de la cual se despejó el tiempo para obtener la ecuación 5.

$$IF = IF_0 e^{kt} \quad (4)$$

$$t = \frac{\ln\left(\frac{IF}{IF_0}\right)}{k} \quad (5)$$

Donde:

IF = índice de fermentación ideal (valor de 1)

IF_0 : valor de índice de fermentación inicial

k : constante cinética de fermentación

t : tiempo de fermentación predicho (días)

Mediante el análisis de los datos del índice de fermentación (IF) y estableciendo también cuando este alcanza un valor de 1 para el modelo matemático, se determinó cuál sería el tiempo de fermentación en los diferentes tratamientos, esto a través del modelo matemático, dónde se ajustó a los datos experimentales de IF para también obtener los valores de las variables IF_0 y k , estos se muestran en la tabla 16.

Tabla 16

Tiempo y cinética de fermentación obtenidos del modelo integral

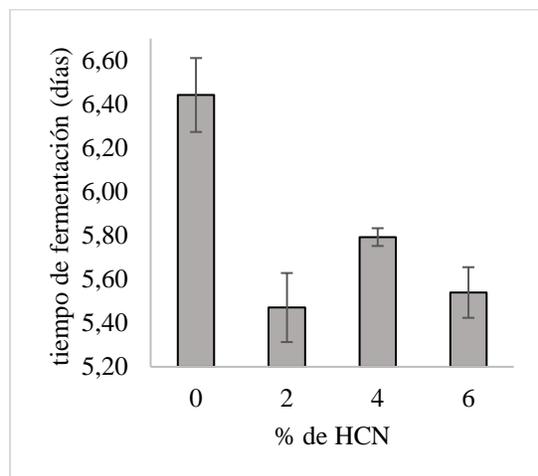
Tratamientos	Cant. HRN %	IF_0	k (h⁻¹)	tiempo (días)
T1	0	0.450	0.124	6.44
T2	2	0.398	0.169	5.47
T3	4	0.396	0.160	5.79
T4	6	0.413	0.160	5.54

A través de una representación gráfica, figura 11, con la desviación estándar de cada tratamiento se demuestra el efecto que existe al adicionar determinadas cantidades de HRN al bioproceso, logrando disminuir el tiempo de fermentación, siendo diferente entre el blanco y cada tratamiento. Mediante este enfoque, se observa que T2 y T4 son aproximadamente iguales en cuanto al efecto del sustrato, y T3 presenta diferencia entre los dos anteriores, siendo T2 el de

menor tiempo de fermentación al ser menor en alrededor 12.72 h respecto a 144 horas de fermentación del experimento.

Figura 11

Relación del tiempo de fermentación con la cantidad de HRN



Tomado de: Autor

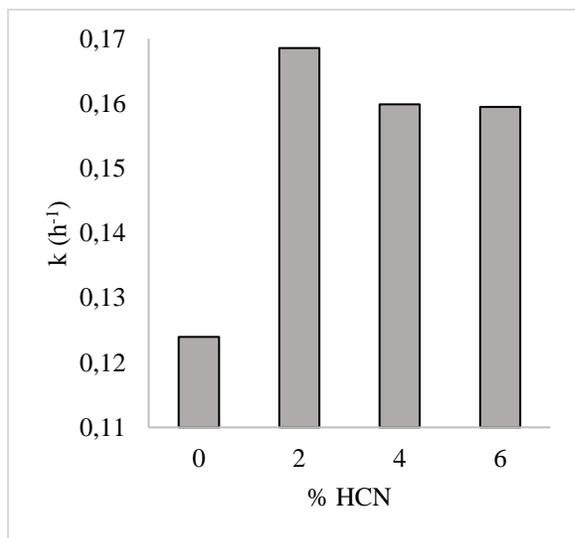
Resultados similares fueron reportados por (Chagas Junior et al., 2021) donde usaron una combinación de cultivos iniciadores de *S. cerevisiae* y *P. kudriavzevii* y redujeron el tiempo de fermentación en 24 h respecto a las 168 h. Por otro lado, según (Elhalis et al., 2023), para el caso del café, *Hanseniaspora uvarum* y *Pichia kudriavzevii* son ideales para la remoción del mucilago debido su fuerte actividad pectinolítica, por lo que se podría utilizar los cultivos iniciadores de microorganismos junto con el sustrato utilizado en este estudio con la finalidad de reducir en mayor medida el tiempo.

Respecto a la cinética de fermentación k^{-1} (figura 12) determinada por el modelo matemático, se evidenció que T2 mostró una mayor velocidad de fermentación mientras que en los demás tratamientos fue inversamente proporcional a la cantidad de sustrato en el medio y su

tasa de consumo respecto al tiempo. Además, se validó la correlación entre ambas variables, tiempo e IF, y se evaluó la precisión del modelo predictivo donde se obtuvo un R promedio igual a 0.96.

Figura 12

Relación de la cinética de fermentación con la cantidad de HRN



Tomado de: Autor

La aceleración del proceso ocurrió por el efecto enzimático principalmente pectinolítico del sustrato, y según lo mencionado por (Ouattara et al., 2017) la acción de este tipo de enzimas tiene su aporte significativo en la fermentación del cacao porque descomponen la pectina presente en la pulpa provocando un aumento en la permeabilidad de los granos.

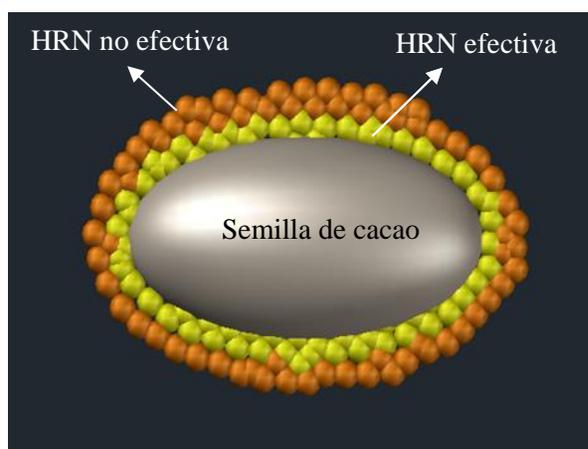
3.3 Optimización de la Proporción de Mezcla en el Proceso de Fermentación

La evaluación de los tratamientos reveló que la correlación entre la cantidad de HRN añadido y el tiempo de fermentación no sigue una proporcionalidad directa, ya que no todas las partículas se encuentran en contacto directo con la semilla, siendo únicamente aquellas adheridas

directamente las que ejercen efecto significativo. Esta observación se respalda con la evidencia visual proporcionada por la figura 13 asumiendo a la semilla como el elipsoide de color grisáceo, donde las partículas de HRN de color amarillo son las que efectivamente generarían actividad pectinolítica en la semilla. En contraste, las partículas de color naranja y todas aquellas que se encuentren externas a la zona de contacto parecen no contribuir al bioproceso, sugiriendo que podrían ser prescindibles en términos de impacto en la fermentación.

Figura 13

Semilla de cacao con partículas de HRN



Tomado de: Autor

Una vez determinada la cantidad de sustrato con la que se obtiene un menor tiempo de fermentación se procedió a realizar un cálculo teórico para determinar la cantidad de harina de cáscara de naranja que podría representar un óptimo teórico de alrededor del 1,2 % (m/m) por kilogramo de semilla de cacao, esto se realizó teniendo en cuenta el volumen teórico y aparente de las semillas, su área superficial, densidad del sustrato y asumiendo que las partículas tienen forma esférica con 1 mm de diámetro, datos que se detallan en la tabla 17.

Tabla 17*Mediciones de la semilla con mucílago y partículas de HRN*

a (cm)	b (cm)	c (cm)	V_s (cm³)	A_s (cm²)	V_p (cm³)	$\rho_p(\frac{g}{cm^3})$
1.44 ± 0.11	1.04 ± 0.10	0.64 ± 0.07	4.04 ± 0.17	13.40 ± 0.17	0.00052	0.6051

*Promedio ± desviación estándar

Respecto al volumen y área superficial de las semillas de cacao, las 3 dimensiones obtenidas (**Anexo VII**) de cada una se dividieron para 2 ya que los valores a, b y c corresponden al radio de cada eje. De esta manera se obtuvo que los granos de clon CCN51 tienen un volumen de $4.04 \pm 0.17 \text{ cm}^3$ y un área superficial de $13.40 \pm 0.17 \text{ cm}^2$. En cuanto a los valores del eje mayor 2R y eje menor 2r se obtuvo un valor promedio de $2.87 \pm 0.11 \text{ cm}$ y $2.09 \pm 0.10 \text{ cm}$, respectivamente. En el estudio realizado por (Becerra et al., 2022) respecto al clon TCS01 obtuvieron valores superiores respecto a 2R ($3.32 \pm 0.26 \text{ cm}$) pero inferior en cuanto a 2r ($1.87 \pm 0.12 \text{ cm}$).

CAPÍTULO IV

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

4.1 Conclusiones

- Se demostró que una vez estandarizada (seca y molida) la harina de cascara de naranja se mantiene la actividad enzimática lo cual es importante para tener efecto en el proceso de fermentación.
- La adición de harina de cáscara de naranja al bioproceso tiene aporte significativo en cuanto a reducción cercano al 20% del tiempo de fermentación
- Se logró estimar la cantidad de harina de cascara de naranja de acuerdo a la superficie aparente de la semilla de cacao.

4.2 Recomendaciones

- Realizar la validación experimental del óptimo local 2% m/m de HRN y dos de sus puntos alrededor 1% y 3% de HRN.
- Realizar análisis organolépticos con el fin de verificar si el sustrato añadido afectó positivo o negativamente en cuanto a la calidad de los granos de cacao.
- Las proporciones de harina de cáscara de naranja utilizadas llevarlas a mayor escala para verificar su viabilidad y utilidad para los productores de cacao.

BIBLIOGRAFÍA

- Almowallad, S. A., Aljobair, M. O., Alkuraieef, A. N., Aljahani, A. H., Alsuhaibani, A. M., & Alsayadi, M. M. (2022). Utilization of agro-industrial orange peel and sugar beet pulp wastes for fungal endo- polygalacturonase production. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 29(2), 963-969. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2021.10.005>
- Alvarado, K. (2021). “*Fermentación de cacao (Theobroma cacao L.) con adición de levadura (Saccharomyces cerevisiae) y enzima (PPO's) en la disminución de metales pesados*”. [UNIVERSIDAD TÉCNICA ESTATAL DE QUEVEDO]. <https://repositorio.uteq.edu.ec/bitstream/43000/6143/1/T-UTEQ-117.pdf>
- Alvarez , C., Tovar , L., García , H., Morillo , F., Sánchez , P., Girón , C., & De Farias, A. (2010). Evaluación de la calidad comercial del grano de cacao (Theobroma cacao L.) usando dos tipos de fermentadores. *10*, 76-87 <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=3909942>
- Angulo Arias, L. V., De Souza Silva, V., Augustus De Oliveira, R., & Matta Fakhouri, F. (2018). Caracterización de subproductos agroindustriales: naranja y maracuyá. *Ingeniería y Región*, 20, 59-66. <https://doi.org/10.25054/22161325.1916>
- Atiaga, J., & Tarco, E. (2022). *Análisis de la cinética del secado de cacao nacional ecuatoriano y mejorado* [Universidad Técnica de Cotopaxi (UTC)]. <http://repositorio.utc.edu.ec/handle/27000/9682>
- Avilés, N., & Tapia, N. (2016). *Obtención de dos tipos de enzimas pectinasa (cáscara de naranja) celulasa (cáscara de plátano) y su evaluación en la producción de pulpa de manzana (Malus domestica) y pera (Pyrus communis) en los laboratorios académicos de la carrera de Ingeniería Agroindustrial de la Universidad Técnica de Cotopaxi en el período 2014 -*

2015. Ingeniería Agroindustrial. UTC. 172 p.
<http://repositorio.utc.edu.ec/handle/27000/2640>
- Ayala, J. R., Montero, G., Coronado, M. A., García, C., Curiel-Alvarez, M. A., León, J. A., . . . Montes, D. G. (2021). Characterization of Orange Peel Waste and Valorization to Obtain Reducing Sugars. *Molecules*, 26(5), 1348. <https://doi.org/10.3390/molecules26051348>
- Becerra, L. D., Zuluaga, M., Mayorga, E. Y., Moreno, F. L., Ruíz, R. Y., & Escobar, S. (2022). Cocoa seed transformation under controlled process conditions: Modelling of the mass transfer of organic acids and reducing sugar formation analysis. *Food and Bioprocess Processing*, 136, 211-225. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.fbp.2022.10.008>
- Bello Gil, D., Carrera Bocourt, E., & Díaz Maqueira, Y. (2015). Determinación de azúcares reductores totales en jugos mezclados de caña de azúcar utilizando el método del ácido 3,5 dinitrosalicílico ICIDCA. Sobre los Derivados de la Caña de Azúcar ICIDCA SG <https://www.redalyc.org/pdf/2231/223120664006.pdf>
- Binh, P. T., HoaiTram, T. T., Thuong, N. V., Thao, P. V., ThamHa, T. T., & Hoang Anh, T. T. (2012). Using invertase (Novozyme) in cocoa for improving bean quality and fermentation process in Vietnam. 8, 93-102. http://www.ijat-aatsea.com/pdf/v8_n1_12_January/9_IJAT_2012_8_1__Phan_Thanh_Binh-Using_invertase_accepted-FX.pdf
- Borrás-Sandoval, L. M., & Torres-Vidales, G. (2016). Producción de alimentos para animales a través de fermentación en estado sólido – FES. *ORINOQUIA*, 20, 47-54.
- Caligiani, A., Marseglia, A., Prandi, B., Palla, G., & Sforza, S. (2016). Influence of fermentation level and geographical origin on cocoa bean oligopeptide pattern. *Food Chemistry*, 211, 431-439. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.05.072>

- Campelo, J. (2020). "Situación actual de los productores de naranja (*Citrus sinensis*) en el Ecuador" [UNIVERSIDAD TÉCNICA DE BABAHOYO]. <http://dspace.utb.edu.ec/bitstream/handle/49000/8500/E-UTB-FACIAG-ING%20AGROP-000102.pdf?sequence=1&isAllowed=y#:~:text=1.5.3.&text>
- Campoverde, N., & Zambrano, G. (2019). *OPTIMIZACIÓN DE LA FERMENTACIÓN Y SECADO DE CACAO (Theobroma cacao L.) VARIEDAD CCN-51 MEDIANTE LA METODOLOGÍA DE ENFOQUE POR PROCESOS EN LA COMUNIDAD DE ZHUCAY* [UNIVERSIDAD ESTATAL DE MILAGRO]. <http://repositorio.unemi.edu.ec/bitstream/123456789/4448/1/OPTIMIZACI%C3%93N%20DE%20LA%20FERMENTACI%C3%93N%20Y%20SECADO%20DE%20CACAO%20%28Theobroma%20cacao%20L.%29%20VARIEDAD%20CCN-51%20MEDIANTE%20L.pdf>
- Castro-Alayo, E. M., Idrogo-Vásquez, G., Siche, R., & Cardenas-Toro, F. P. (2019). Formation of aromatic compounds precursors during fermentation of Criollo and Forastero cocoa. *Heliyon*, 5(1), e01157. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2019.e01157>
- Chagas Junior, G. C. A., Ferreira, N. R., Gloria, M. B. A., Martins, L. H. d. S., & Lopes, A. S. (2021). Chemical implications and time reduction of on-farm cocoa fermentation by *Saccharomyces cerevisiae* and *Pichia kudriavzevii*. *Food Chemistry*, 338, 127834. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.127834>
- Chávez Arias, B. S. (2023). *Obtención de enzimas pectinolíticas mediante fermentación sólida con aspergillus niger a partir de desechos de café* [Tesis de pregrado, Universidad Técnica del Norte]. <http://repositorio.utn.edu.ec/handle/123456789/13737>

- Chávez, C. (2017). *Modelación y estimación de parámetros aplicados al proceso de fermentación del cacao piurano* [Universidad de Piura]. https://pirhua.udep.edu.pe/bitstream/handle/11042/2915/IME_220.pdf?sequence=1&isAllowed=y
- Cocom Cantú, B. A. (2021). ESTUDIO DEL PROCESO DE FERMENTACIÓN DE LOS GRANOS DE CACAO (*Theobroma cacao* L.) EN MÉXICO.
- Cruz, J. (2013). *Determinación de la actividad enzimática de dos enzimas comerciales a diferentes pH, temperatura y concentración de sustrato* [Instituto Tecnológico de Tuxtla Gutiérrez]. http://repositoriodigital.tuxtla.tecnm.mx/xmlui/bitstream/handle/123456789/3103/MDRP_IBQ2013008.pdf?sequence=1&isAllowed=y
- El-Beltagi, H. S., Eshak, N. S., Mohamed, H. I., Bendary, E. S. A., & Danial, A. W. (2022). Physical Characteristics, Mineral Content, and Antioxidant and Antibacterial Activities of *Punica granatum* or *Citrus sinensis* Peel Extracts and Their Applications to Improve Cake Quality. *Plants*, 11(13), 1740. <https://doi.org/10.3390/plants11131740>
- Elhali, H., Cox, J., & Zhao, J. (2023). Yeasts are essential for mucilage degradation of coffee beans during wet fermentation. *Yeast*. <https://doi.org/10.1002/yea.3888>
- Fajardo, D. (2019). *Balance energético de la producción de bioetanol a partir de mucílago de cacao CCN-51 en los cantones Camilo Ponce Enríquez y La Troncal* [Universidad de Cuenca]. <https://dspace.ucuenca.edu.ec/bitstream/123456789/32301/1/Trabajo%20de%20Titulaci%C3%B3n.pdf>

- García, A., & Lozano, M. (2021). *Uso sostenible de la cascara de naranja en el desarrollo de un producto alimenticio* [Escuela Superior Politécnica del Litoral]. <http://www.dspace.espol.edu.ec/handle/123456789/53665>
- García, A., Pico, B., & Jaimez, R. (2021). La cadena de producción del Cacao en Ecuador: Resiliencia en los diferentes actores de la producción. *Novasinerгия*, 165-166.
- Guerra Baños, E. C., Baños Dorantes, M. I., Luna-Jiménez, A. L., González-Cortés, N., & Jiménez-Vera, R. (2020). Caracterización de Harina de Naranja (*Citrus x sinensis*) para Uso Alimentario. *European Scientific Journal ESJ*, 16(6). <https://doi.org/10.19044/esj.2020.v16n6p12>
- Guevara, K. (2017). “ADICIÓN DE ENZIMAS Y LEVADURAS SOBRE LOS CAMBIOS QUÍMICOS Y ORGANOLÉPTICOS DEL CACAO (*Theobroma cacao* L) CLON CCN-51.” [UNIVERSIDAD TÉCNICA ESTATAL DE QUEVEDO]. <http://repositorio.uteq.edu.ec/handle/43000/2283>
- Hernández, M. D. P. L., Núñez, J. C., Gómez, M. S. H., & Tovar, M. D. L. (2019). Physicochemical and microbiological dynamics of the fermentation of the ccn51 cocoa material in three maturity stages. *Revista Brasileira de Fruticultura*, 41(3). <https://doi.org/10.1590/0100-29452019010>
- Hinne, M., Semanhyia, E., Van de Walle, D., De Winne, A., Tzompa-Sosa, D. A., Scalone, G. L. L., . . . Dewettinck, K. (2018). Assessing the influence of pod storage on sugar and free amino acid profiles and the implications on some Maillard reaction related flavor volatiles in Forastero cocoa beans. *Food Research International*, 111, 607-620. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.05.064>

- Horta-Téllez, H. B., Sandoval-Aldana, A. P., Garcia-Muñoz, M. C., & Cerón-Salazar, I. X. (2019). Evaluation of the fermentation process and final quality of five cacao clones from the department of Huila, Colombia. *DYNA*, 86, 233-239.
- INEN. (2015). *NTE INEN 2016 Harina de Trigo. Requisitos*. <https://www.normalizacion.gob.ec/buzon/normas/nte-inen-616-4.pdf>
- Jürgen, V., & Reinhard, L. (2014). Biochemistry of Cocoa Fermentation. In *Fermented foods and beverages series (Cocoa and coffee fermentations)* (pp. 194 - 216). Schwan, Rosane Fleet, Graham.
- Lee, A. H., Neilson, A. P., O'Keefe, S. F., Ogejo, J. A., Huang, H., Ponder, M., . . . Stewart, A. C. (2019). A laboratory-scale model cocoa fermentation using dried, unfermented beans and artificial pulp can simulate the microbial and chemical changes of on-farm cocoa fermentation. *European Food Research and Technology*, 245(2), 511-519. <https://doi.org/10.1007/s00217-018-3171-8>
- Llombart, P. (2021). *Evaluación del impacto del proceso de fermentación en estado sólido con Pleurotus ostreatus en las propiedades de la quinoa* [Universidad Politécnica de Valencia]. <http://hdl.handle.net/10251/173636>
- Lucero, M. (2021). *Técnicas de fermentación del cacao CCN51 y Nacional usando la enzima pectin trans eliminasa como precursor sensorial de la almendra y licor de cacao* [ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA AGROPECUARIA DE MANABÍ MANUEL FÉLIX LÓPEZ] <https://repositorio.espam.edu.ec/bitstream/42000/1365/1/TTAI19D.pdf>
- Martínez, A., Asaquen, J., & Tascón, C. (2011). ENZIMAS: Una alternativa para remover rápida y eficazmente el mucílago del café. <https://www.cenicafe.org/es/publications/avt0406.pdf>

- Melo, V., & Cuamatzi, O. (2019). *Bioquímica de los procesos metabólicos (3a. ed.)*. Editorial Reverte.
- Murillo, G., & Soria, G. (2023). *Métodos de fermentación en el cacao ccn-51 con norma INEN 176 en la parroquia Guasaganda, La Maná* [Universidad Técnica de Cotopaxi]. <http://repositorio.utc.edu.ec/handle/27000/10094>
- Muñoz Briones, P., Almeida-Streitwieser, D., Fonseca-Ashton, J. D., & Alvarez-Barreto, J. F. (2021). Estudio de pre-factibilidad técnica y económica de la implementación de una biorrefinería para la conversión de residuos de cáscara de naranja., *13*, 14. <https://doi.org/10.18272/aci.v13i2.2289>
- Navia, A., & Natalie, P. (2012). Mejoramiento de las características sensoriales del cacao CCN51 a través de la adición de enzimas durante el proceso de fermentación. <https://www.dspace.espol.edu.ec/bitstream/123456789/21147/1/MEJORAMIENTO%20DE%20CARACTERISTICAS%20SENSORIALES%20CACAO%20CCN51.pdf>
- Neira, J., Revilla, K., Aldas, J., & Sánchez, S. (2020). Métodos de fermentación del cacao nacional (theobroma cacao) y su influencia en las características físico-químicas, contenido de cadmio y perfiles sensoriales. *Dialnet*, *21*, 41 - 48, Article 3.
- Ortiz, K., & Álvarez, R. (2015). Efecto del vertimiento de subproductos del beneficio de cacao (Theobroma cacao L.) sobre algunas propiedades químicas y biológicas en una finca cacaotera, Municipio de Yaguará. *Scielo*, *5*. <http://www.scielo.org.co/pdf/bccm/v19n1/v19n1a05.pdf>
- Otárola, A. (2018). “EFECTO DE LA ENZIMA PECTOLÍTICA Y LEVADURA (*Saccharomyces cerevisiae*) EN LA FERMENTACIÓN Y CALIDAD DEL CACAO VAR. CRIOLLO (Theobroma cacao) [Universidad Nacional Federico Villarreal]

<https://1library.co/document/q2gv0opy-efecto-pectolitica-levadura-saccharomyces-cerevisiae-fermentacion-calidad-theobroma.html>

Ouattara, H. G., Reverchon, S., Niamke, S. L., & Nasser, W. (2017). Regulation of the synthesis of pulp degrading enzymes in *Bacillus* isolated from cocoa fermentation. *Food Microbiology*, 63, 255-262. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.fm.2016.12.004>

Parra Rosero, P. (2018). *Modelación de un proceso de secado de cacao utilizando una cámara rotatoria cilíndrica y flujo de aire caliente* [Universidad de Piura]. https://pirhua.udep.edu.pe/bitstream/handle/11042/3488/DOC_ING_AUT_003.pdf?sequence=4&isAllowed=y

Peñaherrera, G. (2021). *Estudio de métodos de fermentación y secado del cacao* [Universidad Central del Ecuador]. <http://www.dspace.uce.edu.ec/bitstream/25000/24717/1/UCE-FCQ-CQA-PE%C3%91AHERRERA%20NANCY.pdf>

Puerta, G., & Echeverry, J. o. G. (2015). Fermentación controlada del café: Tecnología para agregar valor a la calidad 12. <https://www.cenicafe.org/es/publicaciones/avt0454.pdf>

Pérez, M., & Contreras, J. (2017). Instructivo de buenas prácticas de cosecha y postcosecha In (pp. 60). Swisscontact, Bogotá, Colombia.

Quezada, L., Quevedo, J., & García, R. (2017). Determinación del efecto del grado de madurez de las mazorcas en la producción y la calidad sensorial de (*Theobroma cacao L.*). 5, 36-46. <http://aes.ucf.edu.cu/index.php/aes/index>

Racine, K., Lee, A., Wiersema, B., Huang, H., Lambert, J., Stewart, A., & Neilson, A. (2019). Development and Characterization of a Pilot-Scale Model Cocoa Fermentation System Suitable for Studying the Impact of Fermentation on Putative Bioactive Compounds and Bioactivity of Cocoa. *Foods*, 8(3), 102. <https://doi.org/10.3390/foods8030102>

- Rahardjo, Y. P., Rahardja, S., Dalapati, A., Amalia, A. F., Purwaningsih, H., & Syamsu, K. (2022). A literature review on cocoa fermentation techniques to shorten fermentation time. IOP Conference Series: Earth and Environmental Science,
- Ramos, J. (2019). *Diseño de un fermentador orientado a mejorar el proceso de fermentación del cacao criollo blanco de Piura* [Universidad de Piura]. https://pirhua.udep.edu.pe/bitstream/handle/11042/4017/MAS_IME_AUT_033.pdf?sequence=2&isAllowed=y
- Ricci, A., Díaz, A. B., Lazzi, C., & Blandino Garrido, A. M. (2023). Valorization of orange peels exploiting fungal solid-state and lacto-fermentation. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 103(9), 4614-4624. <https://doi.org/10.1002/jsfa.12537>
- Rios, J., & Lévano, D. (2022). Importancia de los dispositivos usados en la fermentación de Cacao (*Theobroma cacao* L.). Retrieved Junio, from <https://revistas.unsm.edu.pe/index.php/raa/article/view/281/339>
- Rojas-Rojas, K., Hernández-Aguirre, C., & Mencía-Guevara, A. (2021). Transformaciones bioquímicas del cacao (*Theobroma cacao* L.) durante un proceso de fermentación controlada. *Agronomía Costarricense*, 45(1), 53-65.
- Romelle, F. D., Rani, A., & Manohar, R. S. (2016). Chemical composition of some selected fruit peels. *European Journal of Food Science and Technology*, 4(4), 12-21.
- Sanchez, M., Mestanza, C., Vargas, Y., Burbano, R., Calero, A., & Ramirez, C. (2019). Evaluation of the Cocoa Bean (*Theobroma Cacao* L.), using Two Fermentators, Orellana and Sucumbios Provinces, Ecuador. 8, 1-7. <http://repositorio.iniap.gob.ec/handle/41000/5389>
- Santander Muñoz, M., Rodríguez Cortina, J., Vaillant, F. E., & Escobar Parra, S. (2020). An overview of the physical and biochemical transformation of cocoa seeds to beans and to

- chocolate: Flavor formation. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 60(10), 1593-1613. <https://doi.org/10.1080/10408398.2019.1581726>
- Serrat Díaz, M., Ussemame Mussagy, C., Camacho Pozo, M. I., Méndez Hernández, A. A., & Bermúdez, R. C. (2016). Valorización de Residuos Agroindustriales Ricos en Pectinas por Fermentación. *Tecnología Química*, 36, 1-13.
- Sinche Bosquez, P. D. (2013). *Evaluación de dos tiempos de fermentación con la adición de la enzima polifenol oxidasa y lavadura Saccharomyces cerevisiae para mejorar las características de calidad (aroma y sabor) del cacao CCN-51-en la UTE Santo Domingo* [Universidad Tecnológica Equinoccial]. <http://repositorio.ute.edu.ec/handle/123456789/19126>
- Tamimi, K. A., Hidayat, C., Utami, T., & Witasari, L. D. (2023). Flavor precursor formation of non-fermented forastero cocoa beans after flavourzyme® and glucose treatment. *LWT*, 184, 114910. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.lwt.2023.114910>
- Teneda Llerena, W. F. (2017). *Mejoramiento del proceso de fermentación del cacao (Theobroma cacao L.): variedad nacional y variedad CCN51*. Universidad Internacional de Andalucía.
- Teye, E., Huang, X., Sam-Amoah, L. K., Takrama, J., Boison, D., Botchway, F., & Kumi, F. (2015). Estimating cocoa bean parameters by FT-NIRS and chemometrics analysis. *Food Chemistry*, 176, 403-410. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.12.042>
- Torres-Valenzuela, L. S., Martínez, K. G., Serna-Jimenez, J. A., & Hernández, M. C. (2019). Secado de Pulpa de Café: Condiciones de Proceso, Modelación Matemática y Efecto sobre Propiedades Fisicoquímicas. *Información tecnológica*, 30, 189-200.
- Vílchez Vargas, N. (2017). Efecto del material del fermentador, en el grado de fermentación de granos de cacao (Theobroma cacao l, clon: CCN-51).

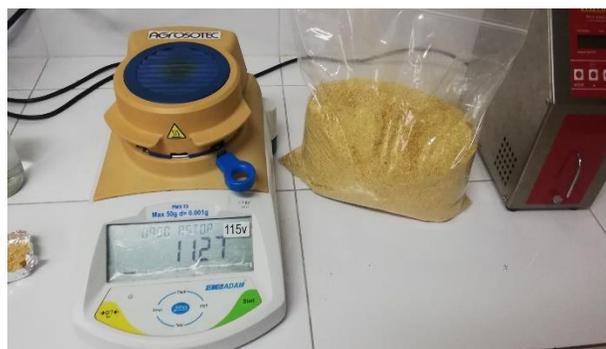
Zapata Arevalo, R. A. (2002). *Determinación del tiempo óptimo de fermentación mediante el uso de micro fermentadores y la variabilidad en la calidad de las almendras de seis clones de cacao (Theobroma cacao L) en la región amazónica ecuatoriana* [Universidad Técnica de Babahoyo]. <https://repositorio.iniap.gob.ec/handle/41000/3746>

Zúñiga-García, D., Montaleza-Auquilla, M., Andrade, D., León-Vizñay, J., Ramírez, P., Criollo-Ayala, A., . . . Andrade-Tenesaca, S. (2020). Cinética de fermentación láctica natural de col blanca (*Brassica oleracea L. capitata*). *MASKANA*, 11(1), 57-68. <https://doi.org/10.18537/mskn.11.01.05>

ANEXOS

Anexo I

Estandarización de los residuos de cáscara de naranja



Anexo II

Fase experimental del proceso de fermentación del cacao



Anexo III

Medición de pH



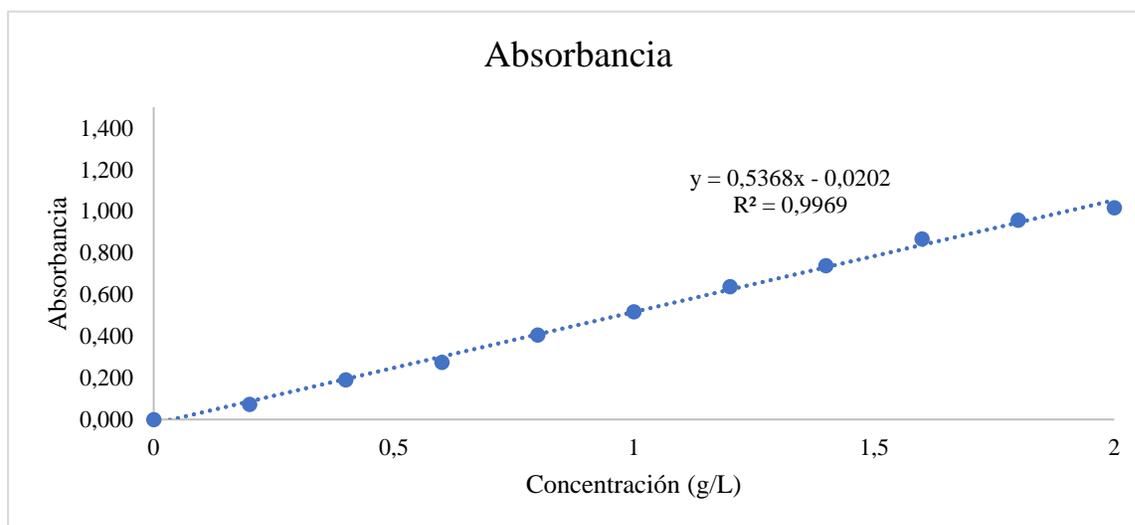
Anexo IV

Índice de fermentación



Anexo V

Método DNS y curva de calibración de glucosa



Anexo VI

Valores de absorbancia a 460 nm y 530 nm

Absorbancias a 460 nm								
Tiempo (días)	T1 (testigo)		T2		T3		T4	
	R1	R2	R1	R2	R1	R2	R1	R2
1	0,2827	0,2861	0,2467	0,3026	0,2520	0,2467	0,2682	0,3037
1	0,2831	0,2862	0,2466	0,3031	0,2519	0,2466	0,2682	0,3048
1	0,2830	0,2863	0,2467	0,3027	0,2519	0,2469	0,2686	0,3035
promedio	0,2829	0,2862	0,2467	0,3028	0,2519	0,2467	0,2683	0,3040
2	0,4046	0,2564	0,2778	0,3295	0,2688	0,3016	0,2367	0,2736
2	0,4047	0,2564	0,2778	0,3296	0,2689	0,3016	0,2367	0,2736
2	0,4049	0,2564	0,2779	0,3295	0,2689	0,3017	0,2366	0,2734
promedio	0,4047	0,2564	0,2778	0,3295	0,2689	0,3016	0,2367	0,2735
3	0,2091	0,3218	0,3433	0,3960	0,4442	0,3298	0,3329	0,2357
3	0,2091	0,3218	0,3433	0,3968	0,4444	0,3300	0,3329	0,2358
3	0,2093	0,3220	0,3433	0,3967	0,4445	0,3304	0,3330	0,2360
promedio	0,2092	0,3219	0,3433	0,3965	0,4444	0,3301	0,3329	0,2358
4	0,2687	0,2746	0,3939	0,3430	0,3303	0,4040	0,4932	0,4713
4	0,2687	0,2748	0,3942	0,3431	0,3306	0,4044	0,4934	0,4718
4	0,2686	0,2746	0,3940	0,3431	0,3306	0,4045	0,4935	0,4717
promedio	0,2687	0,2747	0,3940	0,3431	0,3305	0,4043	0,4934	0,4716
5	0,6106	0,3484	0,4324	0,5871	0,5241	0,6217	0,4367	0,4958
5	0,6106	0,3485	0,4326	0,5871	0,5241	0,6220	0,4376	0,4958
5	0,6106	0,3484	0,4324	0,5874	0,5237	0,6205	0,4372	0,4959
promedio	0,6106	0,3484	0,4325	0,5872	0,5240	0,6214	0,4372	0,4958
6	0,5740	0,3701	0,4881	0,6445	0,4631	0,4908	0,5357	0,6091
6	0,5739	0,3703	0,4881	0,6445	0,4632	0,4908	0,5361	0,6091
6	0,5740	0,3703	0,4881	0,6445	0,4631	0,4908	0,5362	0,6089
promedio	0,5740	0,3702	0,4881	0,6445	0,4631	0,4908	0,5360	0,6090

Absorbancias a 530 nm								
Tiempo (días)	T1 (testigo)		T2		T3		T4	
	R1	R2	R1	R2	R1	R2	R1	R2
1	0,5451	0,5227	0,4136	0,5833	0,4496	0,4672	0,4668	0,5882
1	0,5451	0,5227	0,4137	0,5832	0,4496	0,4670	0,4666	0,5880
1	0,5450	0,5225	0,4137	0,5832	0,4494	0,4668	0,4667	0,5882
promedio	0,5451	0,5226	0,4137	0,5832	0,4495	0,4670	0,4667	0,5881
2	0,7937	0,4293	0,5296	0,6080	0,4874	0,6140	0,4253	0,5075
2	0,7937	0,4288	0,5296	0,6081	0,4875	0,6137	0,4253	0,5077
2	0,7938	0,4285	0,5295	0,6082	0,4875	0,6137	0,4253	0,5075
promedio	0,7937	0,4289	0,5296	0,6081	0,4875	0,6138	0,4253	0,5076
3	0,3171	0,5444	0,5645	0,7119	0,7493	0,5963	0,5807	0,3945
3	0,3172	0,5447	0,5647	0,7127	0,7495	0,5968	0,5807	0,3948
3	0,3171	0,5448	0,5647	0,7125	0,7497	0,5971	0,5806	0,3948
promedio	0,3171	0,5446	0,5646	0,7124	0,7495	0,5967	0,5807	0,3947
4	0,3979	0,3362	0,5453	0,4890	0,4470	0,5783	0,6276	0,6184
4	0,3980	0,3363	0,5454	0,4889	0,4472	0,5786	0,6277	0,6187
4	0,3979	0,3362	0,5454	0,4889	0,4474	0,5786	0,6277	0,6184
promedio	0,3979	0,3362	0,5454	0,4889	0,4472	0,5785	0,6277	0,6185
5	0,8035	0,3488	0,3722	0,6255	0,5685	0,6346	0,4619	0,4919
5	0,8035	0,3488	0,3724	0,6256	0,5680	0,6347	0,4618	0,4920
5	0,8035	0,3489	0,3721	0,6255	0,5688	0,6346	0,4618	0,4919
promedio	0,8035	0,3488	0,3722	0,6255	0,5684	0,6346	0,4618	0,4919
6	0,7018	0,3593	0,4489	0,6257	0,4514	0,4881	0,4686	0,6211
6	0,7019	0,3593	0,4491	0,6257	0,4514	0,4880	0,4685	0,6212
6	0,7017	0,3590	0,4491	0,6258	0,4514	0,4881	0,4684	0,6212
promedio	0,7018	0,3592	0,4490	0,6257	0,4514	0,4881	0,4685	0,6212

Anexo VII

Mediciones de la altura, ancho y grosor de la semilla de cacao

ORD	2R (cm)	2r (cm)	x (cm)
1	2,75	2,18	1,35
2	3,00	2,43	1,06
3	3,02	2,14	1,35
4	2,44	2,20	1,06
5	3,03	2,19	1,19
6	2,75	2,02	1,34
7	2,35	1,77	1,35
8	2,38	1,76	1,18
9	3,03	2,20	1,01
10	2,75	1,70	1,30
11	3,04	2,19	1,51
12	2,75	1,74	1,44
13	2,45	1,75	1,05
14	2,81	1,92	1,24
15	2,68	2,14	1,50
16	2,93	2,19	1,06
17	3,03	2,21	1,02
18	2,78	2,19	1,05
19	2,78	2,00	1,11
20	2,56	1,78	1,28
21	2,72	2,08	1,52
22	2,72	2,29	0,99
23	2,96	2,09	1,19
24	2,77	2,20	1,20
25	3,00	2,17	1,01
26	3,04	2,28	1,27
27	2,72	2,01	1,44
28	2,72	2,26	1,21
29	2,71	1,91	1,44
30	3,04	1,94	1,22
31	2,73	2,26	1,26
32	2,79	1,94	1,51
33	2,78	2,03	1,19
34	3,02	2,21	1,27
35	3,02	2,28	1,20
36	2,73	2,03	1,27
37	2,73	2,21	1,41
38	2,08	1,28	1,42
39	2,96	2,01	1,26
40	3,25	2,01	1,27

41	2,78	2,19	1,51
42	2,78	2,20	1,55
43	2,93	2,08	1,52
44	3,00	2,16	1,44
45	3,02	2,02	1,42
46	2,73	2,22	1,25
47	3,03	2,22	1,27
48	2,79	1,93	1,25
49	2,97	2,02	1,27
50	3,05	2,20	1,20
51	3,03	2,21	1,18
52	3,00	2,16	1,20
53	3,03	2,16	1,40
54	2,78	2,19	1,18
55	2,96	2,20	1,44
56	3,21	2,16	1,20
57	3,23	2,28	1,43
58	2,95	2,19	1,43
59	2,93	2,22	1,19
60	2,97	2,20	1,20
61	2,72	1,94	1,55
62	2,79	1,56	1,40
63	2,93	2,02	1,25
64	2,78	2,28	1,41
65	3,22	2,12	1,51
66	2,96	2,03	1,19
67	3,05	2,02	1,19
68	3,22	2,01	1,20
69	2,07	1,93	1,25
70	2,95	1,70	1,19
71	3,00	2,14	1,30
72	3,18	2,15	1,34
73	2,81	2,21	1,38
74	3,02	2,18	1,34
75	2,98	2,49	1,19
76	3,09	2,31	1,01
77	3,06	2,44	1,51
78	3,08	2,17	1,35
79	3,01	2,20	1,50
80	2,82	1,71	1,44
promedio	2,87	2,09	1,29
SD	0,11	0,10	0,07