

UNIVERSIDAD DR. JOSÉ MATÍAS DELGADO

RED BIBLIOTECARIA MATÍAS

DERECHOS DE PUBLICACIÓN

DEL REGLAMENTO DE GRADUACIÓN DE LA UNIVERSIDAD DR. JOSÉ MATÍAS DELGADO

Capítulo VI, Art. 46

“Los documentos finales de investigación serán propiedad de la Universidad para fines de divulgación”

PUBLICADO BAJO LA LICENCIA CREATIVE COMMONS

Reconocimiento-NoComercial-SinObraDerivada 3.0 Unported.

<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/3.0/deed.es> ES



“No se permite un uso comercial de la obra original ni la generación de obras derivadas.”

Para cualquier otro uso se debe solicitar el permiso a la Universidad

UNIVERSIDAD DR. JOSE MATIAS DELGADO
FACULTAD DE AGRICULTURA E INVESTIGACION AGRICOLA
"JULIA HILL O' SULLIVAN"

SEMINARIO DE INVESTIGACIÓN REFERENTE A:
**"EVALUAR Y DETERMINAR LOS FACTORES FÍSICOS-QUÍMICOS Y
MICROBIOLÓGICO SOBRE EL ÍNDICE DE FERMENTACIÓN TRADICIONAL Y
NO TRADICIONAL DEL GRANO CACAO (THEOBROMA CACAO)
FORASTERO, CULTIVADO EN LA HACIENDA SAN JOSÉ DEL REAL LA
CARRERA - USULUTÁN"**

PRESENTADO POR: BR. JESSICA BERCIAN DE MENDOZA
BR. DIANA VANESA MATA CONRADO

PARA OPTAR AL GRADO DE: INGENÍERAS EN ALIMENTOS

ASESOR: DR. RODRIGO REYES

ANTIGUO CUSCATLAN, 24 DE SEPTIEMBRE DE 2012

Índice general

Introducción	i-ii
Capítulo I	
1.1.1 Origen.....	1
1.1.2 Características	2
1.1.3 Generalidades	3
1.1.4 Descripción de la planta de cacao	3
1.1.4.1 Copas / Hojas	4
1.1.4.2 Tronco / Ramas	4
1.1.4.3 Ortotrópicos o chupones	4
1.1.4.4 Corteza	5
1.1.4.5 Flores	5
1.1.4.6 Frutos	5
1.1.4.7 Semillas	7
1.1.4.8 Raíz	6-7
1.1.4.9 Sexualidad	7
1.1.5 Clasificación científica	7
1.2 Planteamiento del problema	8-9
1.3 Objetivos	10
1.3.1 Objetivo general	10
1.3.2 Objetivo específico	10
1.4 Justificación	11-12
Capítulo II	
2.1 Revisión de literatura	13
2.1.1 La fermentación	13
2.1.2 La fermentación de los azúcares de la pulpa	13-14
2.1.3 Importancia de la fermentación del cacao	15
2.1.4 Cambios internos en los granos durante la fermentación	16
2.1.5 Cambios externos en los granos durante la fermentación	16

2.1.6 Fin de la fermentación – comienzo del secado	17
2.1.7 Secado de granos fermentados	17-18
2.1.8 Importancia del secado solar	18
2.1.9 Factores que influyen en la fermentación	18-19
2.1.10 Condiciones críticas para producir granos fermentados	19
2.1.11 Una buena fermentación	19
2.2 Descripción de los medios de cultivo para las siembras	21
2.2.2 Medio de ácido acético-etanol RAE	21
2.2.3 Agar MRS	21
2.2.4 Agar estándar	21
2.2.5 PDA	22
2.3 Antecedentes	23-24

Capítulo III

3.1 Metodología	25-26
3.2. Método tradicional en cajas de madera y plástico	27
3.2.1 Recolección de las muestras	27
3.2.2 Preparación de las muestras	27
3.2.3 Pesado de las mazorcas	27-28
3.2.4 Extracción de las semillas	28-29
3.2.5 Medición de diámetro de las semillas	29
3.3 Preparación de cajas para proceso de fermentación	30-31
3.4 Análisis físico químico	31
3.4.1 Medición de pH	31-32
3.4.2 Medición de temperatura	32-33
3.4.3 Determinación de % de alcohol	33
3.4.4 Medición de porcentual de ácido acético	34
3.4.5 Medición de grados °Brix	34-35
3.5 Análisis microbiológico	35
3.5.1 Preparación de medios de cultivo	35-36

3.5.2 Preparación de RAE	36-37
3.5.3 Preparación de MRS	37
3.5.4 Preparación de agar estándar	38
3.5.5 Preparación de agar patata dextrosa	38
3.6 Siembra de muestras	39-40
Capítulo IV	
4.1 Discusión de resultados	41
4.1.1 Resultados físico-químicos	41
4.1.2 Método tradicional	41-47
4.2. Método no tradicional	48-53
4.3 Resultado microbiológico	54-57
Capítulo V	
5.1 Conclusiones	70-72
5.2 Recomendaciones	73
Capítulo VI	
6.1 Bibliografía	74-75
Anexos	
Anexo 1	76-107
Anexo 2	108-110
Anexo 3	111-123
Glosario	124-125

Índice tabla

Tabla 1	medidas de semillas método tradicional.....	41
Tabla 2	resultados fisicoquímicos método tradicional día 1	42
Tabla 3	resultados fisicoquímicos método tradicional día 2	43
Tabla 4	resultados fisicoquímicos método tradicional día 3	44
Tabla 5	resultados fisicoquímicos método tradicional día 4	45
Tabla 6	resultados fisicoquímicos método tradicional día 5	46
Tabla 7	resultados fisicoquímicos método tradicional día 6	47
Tabla 8	medidas de semillas método no tradicional	48
Tabla 9	resultados fisicoquímicos método no tradicional día 1	49
Tabla 10	resultados fisicoquímicos método no tradicional día 2	50
Tabla 11	resultados fisicoquímicos método no tradicional día 3	51
Tabla 12	resultados fisicoquímicos método no tradicional día 4	52
Tabla 13	resultados fisicoquímicos método no tradicional día 5	53
Tabla 14	resultados microbiológicos en método tradicional.....	54
Tabla 15	resultados microbiológicos en método tradicional duplicado	55
Tabla 16	resultados microbiológicos en método no tradicional.....	56
Tabla 17	resultados microbiológicos en método no tradicional	57
Tabla 18	parámetros microbiológicos de método tradicional caja de madera A	58
Tabla 19	parámetros microbiológicos de método tradicional caja de madera A-2	59
Tabla 20	parámetros microbiológicos de método tradicional caja de madera B	60
Tabla 21	parámetros microbiológicos de método tradicional caja de madera B-2	61

Tabla 22	parámetros microbiológicos de método tradicional caja de madera C	62
Tabla 23	parámetros microbiológicos de método no tradicional caja C-2	63
Tabla 24	parámetros microbiológicos de método no tradicional recipiente A	64
Tabla 25	parámetros microbiológicos de método no tradicional recipiente A-2	65
Tabla 26	parámetros microbiológicos de método no tradicional recipiente B	66
Tabla 27	parámetros microbiológicos de método no tradicional recipiente B-2	67
Tabla 28	parámetros microbiológicos de método no tradicional recipiente C	68
Tabla 29	parámetros microbiológicos de método no tradicional recipiente C-2	69

Índice de figuras

Figura 1	Origen del cacao	1
Figura 2	Tipos de cacao: trinitario, criollo, forastero	2
Figura 3	Fruto de cacao	3
Figura 4	Árbol de cacao	4
Figura 5	Hojas de árbol de cacao	4
Figura 6	Flor de árbol de cacao	5
Figura 7	Fruto de árbol de cacao	6
Figura 8	Semillas de fruto de cacao	6
Figura 9	Mazorca de cacao tipo forastero cortada transversalmente	13
Figura 10	Grafico de sucesión en la fermentación en el cacao	14
Figura 11	granos de cacao semillas frescas, 2 y 5 días fermentado	15
Figura 12	granos de cacao fermentado	16
Figura 13	granos de cacao seco y sus productos	20
Figura 14	diferentes tipos de confites de chocolate	20

Índice de anexos

Anexo 1	Fotografías de la ejecución de los análisis y prácticas realizadas.....	76-107
Anexo 2	Formulaciones de medios de cultivo.....	108-110
Anexo 3	Análisis bromatológico	111-123

INTRODUCCIÓN

El árbol del cacao o cacaotero tiene como nombre científico *Theobroma cacao* L. que proviene del griego y significa "alimento de los dioses". "La palabra cacao proviene del maya "Kaj", que quiere decir amargo y "kab", que quiere decir jugo. Éstas dos palabras, al pasar fonéticamente al castellano, sufrieron una serie de transformaciones que terminaron en "cacaotal", que luego pasó a cacao". (Curso sobre el cultivo de cacao/Gustavo Enríquez).

Para Maxine Clark "Según las huellas pictóricas halladas en cuevas prehistóricas, cuadros y manuscritos medievales, sabemos que el grano de cacao fue cultivado y usado en la Mesoamérica precolombina tropical (Centro América) por los olmecas, mayas, toltecas y aztecas (de los que se obtiene el nombre original del chocolate cacaua tl o xocolatl). Ésto remonta el cacao legendario al año 2000 a.c"

En la actualidad El Salvador es el país Centroamericano que produce menos cacao .El área cultivada es de 350 hectáreas y la producción que se destina al mercado nacional, es un cultivo con mucha demanda.

La mayor importación con respecto a los últimos diez años, se ha dado en 2007, sobrepasando las 800 TM, correspondientes a \$623, 000. Las importaciones de cacao en grano, de 2001 a 2007 muestran a Nicaragua como el principal proveedor de cacao para El Salvador con una participación de 64%. Sin embargo, la mayor cantidad de exportaciones de cacao procesado también están destinadas a Nicaragua.

En el Año 2007 el 33% de las exportaciones totales fueron hacia Nicaragua; le sigue Guatemala con 26%, Honduras con el 22%.

Actualmente en El Salvador se tienen zonas productoras de cacao, existen ciertas fincas pequeñas y medianas, que son iniciativas dispersas que mantienen el cultivo del mismo, como es el caso de la hacienda San José del Real La Carrera, Usulután (Revista Akademos, Año 4, vol. 2, n° 10, mayo-agosto 2010.)

El cacao se cultiva principalmente en África del Oeste, América Central, Suramérica y Asia. Según la producción anual, recogida por la UNCTAD para el año agrícola 2005/06 los ocho mayores países productores del mundo son (en orden descendente) Costa de Marfil (38%), Ghana (19%), Indonesia (13%), Nigeria (5%), Brasil (5%), Camerún (5%), Ecuador (4%) y Malasia (1%). Éstos países representan el 90% de la producción mundial. Los principales productores son también los mayores exportadores, con excepción de Brasil y Malasia cuyo consumo interno absorbe la mayor parte de su producción. En América Latina, por ejemplo, las exportaciones de cacao de República Dominicana superan a las de Brasil. (UNCTAD 2007)

A pesar del conocimiento de su importancia, procedencia, cultivo, producción y variedades no existen datos sobre la fermentación que se presenta en los diferentes ecotipos. Es por ello que, el presente estudio, tiene como objetivo conocer los factores físico-químicos y microbiológicos del índice de fermentación tradicional y no tradicional del grano de cacao forastero limitando la zona de estudio a las semillas ubicadas en el departamento de Usulután específicamente en la Hacienda San José del Real la Carrera ya que en ésta zona se encuentra la mayor área de cultivo de cacao. Realizándole posteriormente a las semillas de las mazorcas de las accesiones en estudio, exámenes físico- químicos y microbiológico.

Capítulo I

1.1.1 Origen

El cacao, *Theobroma cacao* L, es una planta de origen americano. Debido al sistema de vida nómada que siempre llevaron los habitantes de éste continente, es prácticamente imposible decir a ciencia cierta cuál fué el origen. De acuerdo con estudios el cacao es originario de América del Sur, en el área del alto amazonas, que comprende Colombia, Ecuador, Perú y Brasil. Es en éste último lugar dónde se ha encontrado la mayor variabilidad de la especie.

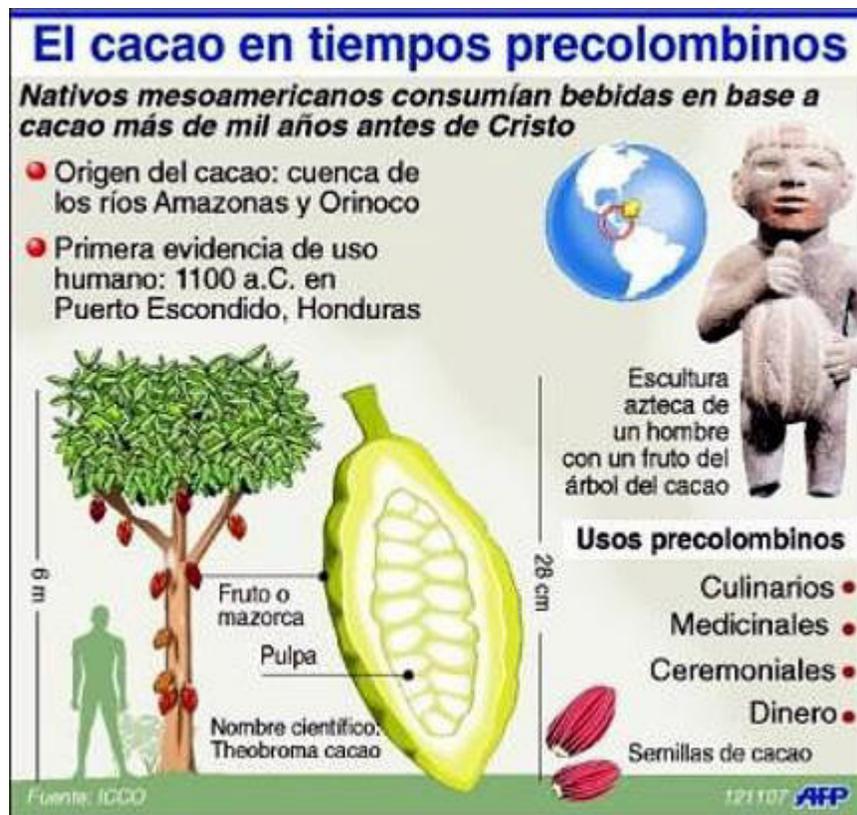


Figura No 1 fotografía de origen del cacao. Fuente: Artículo “Cacao Mexicano” disponible en www.tramayano1.blogspot.com

1.1.2 Características

El cacaotero es un árbol que necesita de humedad y de calor. Es de hoja perenne y siempre se encuentra en floración, crece entre los 6 y los 10 m de altura. Requiere sombra (crecen a la sombra de otros árboles más grandes como cocoteros y plataneros), protección del viento.

El forastero: Se trata de un cacao normal, con el tanino más elevado. Es el más cultivado y proviene normalmente de África. El grano tiene una cáscara gruesa, es resistente y poco aromático. Para neutralizar sus imperfecciones, requiere un intenso tueste, de dónde proceden el sabor y el aroma a quemado de la mayoría de los chocolates. Los mejores productores usan granos forasteros en sus mezclas, para dar cuerpo y amplitud al chocolate, pero la acidez, el equilibrio y la complejidad de los mejores chocolates proviene de esta variedad.

El forastero, las semillas son pequeñas y algo aplanadas con cotiledones de color violeta oscuro, algunas veces casi negro, de forma triangular y sabor astringente.



Figura No 2 fotografía de tipos de Cacao: trinitario, criollo y forastero. Fuente: www.fototravel.com

Características de fruto de cacao forastero:

- Plantas vigorosas,
- Flor morada,
- Alta variabilidad en la morfología del fruto,
- Mesocarpio firme y grueso
- Almendras violeta o púrpura,
- Semilla triangular de sección plana,



Figura No 3 fotografía fruto de cacao. Fuente Hacienda La Carrera, Usulután, Dep. De El Salvador. C.

1.1.3 Generalidades

Los cacaos forasteros son los cacaos corrientes cultivados en algunos países de Centro y Sur América, Brasil, Oeste Africano (introducido de Brasil), Ecuador (Nacional o Arriba), éste último corresponde a un forastero amazónico evolucionado, considerado como forastero fino a pesar de que su afinidad botánica lo coloca junto a las clases ordinarias. El tipo forastero amazónico es predominante en toda la cuenca del Amazonas, de allí deriva su nombre.

1.1.4 DESCRIPCIÓN DE LA PLANTA DE CACAO

1.1.4.1 Forma: árbol de pequeña talla, perennifolio, de 4 á 7 m de altura (cultivado). El cacao silvestre puede crecer hasta 20 m ó más.



Figura No 4 fotografía de árbol de cacao.
Fuente: <http://www.lookfordiagnosis.com>

1.1.4.2 Copa / Hojas: copa baja, densa y extendida. Hojas grandes, alternas, colgantes, elípticas u oblongas, de (15) 20 á 35 (50) cm de largo por 4 a 15 cm de ancho, de punta larga, ligeramente gruesas, margen liso, verde oscuro en el haz y más pálidas en el envés, cuelgan de un pecíolo.



Figura No 5 fotografía de hojas de árbol de cacao. **Fuente** Hacienda La Carrera, Usulután, dep. De El Salvador. C. A.

1.1.4.3 Tronco / Ramas: el tronco tiene un hábito de crecimiento di mórfico, con brotes

1.1.4.4 Ortotrópicos o chupones: ramas plagiotrópicas o en abanico. Las ramas primarias se forman en verticilos terminales con 3 a 6 ramillas; al conjunto se le llama "molinillo".

1.1.4.5 Corteza: externa de color castaño oscuro, agrietada, áspera y delgada. Interna de color castaño claro, sin sabor.

1.1.4.6 Flor(es): se presentan muchas flores en racimos a lo largo del tronco y de las ramas, sostenidas por un pedicelo de 1 a 3 cm. La flor es de color rosa, púrpura y blanca, de pequeña talla, de 0.5 a 1 cm de diámetro y 2 a 2.5 cm de largo, en forma de estrella. Pétalos 5, de 6 mm de largo, blancos o teñidos de rosa, alternos con los sépalos y de forma muy singular: comienzan estrechos en la base, se ensanchan y se hacen cóncavos para formar un pequeño capuchón y terminan en una lígula; sépalos 5, rosas, angostos, puntiagudos, ampliamente extendidos. Las inflorescencias después de producir flores durante varios años se convierten en tubérculos engrosados que reciben el nombre de "cojinetes florales".



Figura No 6 fotografía de flor de árbol de cacao. Fuente Hacienda La Carrera, Usulután, Dep. De El Salvador. C. A.

1.1.4.6 Fruto(s): el fruto una baya grande comúnmente denominada "mazorca", carnosa, oblonga a ovada, amarilla o purpúrea, de 15 a 30 cm de largo por 7 a 10 cm de grueso, puntiaguda y con camellones longitudinales; cada mazorca contiene en general entre 30 y 40 semillas dispuestas en placentación axial e incrustadas en una masa de pulpa desarrollada de las capas externas de la testa.



Figura No 7 fotografía de fruto de árbol de cacao. Fuente Hacienda La Carrera, Usulután, dep. de El Salvador. C. A.

1.1.4.7 Semilla(s): semillas grandes del tamaño de una almendra, color chocolate o púrpúreo, de 2 a 3 cm de largo y de sabor amargo. No tiene albumen y están recubiertas por una pulpa mucilaginosa de color blanco y de sabor dulce y acidulado. Todo el volumen de la semilla en el interior está prácticamente ocupado por los 2 cotiledones del embrión. Se les llama vulgarmente "habas" o "granos" de cacao. Ricas en almidón, en proteínas, en materia grasa, lo cual les confiere un valor nutritivo real.



Figuran No 8 semillas de fruto de cacao. Fuente Hacienda La Carrera, Usulután, dep. de El Salvador. C. A.

1.1.4.8 Raíz: El sistema radical se compone de una raíz pivotante que en condiciones favorables puede penetrar más de 2 m de profundidad, favoreciendo el reciclaje de

nutrientes y de un extenso sistema superficial de raíces laterales distribuidas alrededor de 15 cm debajo de la superficie del suelo.

1.1.4.9 Sexualidad: Hermafrodita

1.1.5 Clasificación científica

Reino: Plantae

Subreino: Tracheobionta

División: Magnolióphyta

Clase: Magnoliópsida

Subclase: Dilleniidae

Orden: Malvales

Familia: Malvaceae

Subfamilia: Byttnerioideae

Tribu: Theobromeae

Género: Theobroma

Especie: T. cacao

Nombre binomial: Theobroma cacao L.

1.2 Planteamiento del problema

La investigación tiene como objetivo principal evaluar y determinar los factores físicos químicos y microbiológicos, que están involucrados en el índice de fermentación bajo los sistemas tradicionales y no tradicionales de los granos de cacao específicamente del ecotipo Forastero. Con esto se trata de identificar cuáles serían las diferencias que existen en ambos métodos de fermentación, a manera de contribuir a incrementar la calidad del cacao mediante la generación de nuevas tecnologías que permitan identificar éstos factores que influyen en la calidad, en cuanto a sabor y aroma del chocolate como producto terminado.

Esta investigación se desarrolló desde la fase experimental de campo, en la hacienda San José del Real La Carrera, Usulután; principal productora a nivel nacional de cacao con una extensión cultivada de 250 manzanas. Actualmente no se cuenta con ninguna estrategia agronómica para identificar la calidad de dichos cacaotales, sólo se tienen identificado por ecotipos forasteros, acriollados y trinitarios; desde hace muchos años no se ha llevado ningún control de calidad, aproximadamente desde comienzo de la guerra hasta hoy en día, Por otra parte el proceso de beneficiado en la etapa de fermentación se tiene el problema que no se ha establecido ningún protocolo. Debido a éstas circunstancias es que se realizó un estudio para establecer cuáles son los parámetros o los puntos críticos de control que hay que monitorear y de ésta manera estandarizar un proceso que sea fácil y práctico de aplicar sin independencia de altas tecnologías costos o falta de capacidad técnica por parte de los operarios durante la etapa de fermentación, por lo que se hace necesario evaluar y determinar los factores que influyen, específicamente en el proceso de fermentación y así la evaluación de los efectos que tiene el índice fermentativo mediante el proceso de inducción de inóculo para acortar los

tiempos en los procesos tradicionales; con ésto se realizó un aporte para la caracterización sobre los efectos que transcurren internamente en la semilla, para evidenciar diferencias entre los ecotipos cultivados en la hacienda. Por todo lo anterior se hace necesario planteamos la siguiente incógnita.

¿Será posible que mediante la inducción de inóculos de levaduras en la fermentación se puedan cambiar las características físicas y químicas de las semillas y que a partir de ahí se mejore la calidad de la semilla del ecotipo Forastero, comparado con los sistemas tradicionales utilizados en la actualidad y de ésta manera ofrecer un producto de mejor calidad del que actualmente se tiene?

1.3 Objetivos

1.3.1 Objetivo General:

Evaluar y determinar los factores físicos-químicos y microbiológicos que sucede durante la fermentación en el método tradicional y no tradicional del grano de cacao Forastero.

1.3.2 Objetivos Específicos:

1. Evaluar los factores que influyen en la calidad de las semillas a partir de la fermentación en el ecotipo de cacao Forastero, cultivado en la zona de Usulután
2. Determinar las características agromorfológicas del fruto del cacao Forastero.
3. Evaluar los diferentes índices de temperatura, pH, porcentaje de Azúcar y acidez, que intervienen en los métodos tradicional y no tradicional de la fermentación del cacao

1.4 Justificación

El cacao dá origen a uno de los productos más deliciosos del mundo. El chocolate fué primero utilizado para la creación de una bebida en la época de los mayas desde México hasta gran parte del área centroamericana, desde entonces las semillas de cacao han servido como elemento de trueque. Actualmente se busca cacaos finos de aroma, que precisamente se encuentran en nuestras zonas, consideradas como cacaos de excelente calidad debido a su historial.

La calidad del cacao es muy variable, y ésto se debe a la diversidad y variabilidad genética que existe en el cacao, tanto al nivel de poblaciones silvestres cómo en poblaciones domésticas (híbridos o clones); ésto nos lleva permanentemente a un gran desafío, especialmente a quienes están involucrados directa o indirectamente en éste tipo de investigaciones, ya que se trata de identificaciones a partir de sus características agromorfológicas; tomando en cuenta que se debe lograr descubrir la existencia de cacaos de buena calidad.

Actualmente en El Salvador, el cacao no se ha desarrollado y se mantiene mediante huertos familiares; es decir en pequeños parcelas de cultivos que no exceden más de una manzana en algunos casos. El lugar dónde mayor extensión de cultivo se tiene es en la Hacienda San José del Real La Carrera, Usulután, en dónde se encuentra, de acuerdo a investigaciones realizadas en el tema agromorfológico, las tres principales variedades de cacao que se comercializan a nivel internacional (acriollado, trinitario y forastero), y que hasta el momento no se ha desarrollado ninguna investigación orientada a incrementar la producción y calidad del cacao, ni propuestas de estrategias de desarrollo empresarial para el aprovechamiento de oportunidades de mercado a nivel nacional o internacional. Por ésta razón esta investigación se planteo en mejorar el proceso de fermentación en el

beneficiado de las semillas del ecotipo Forastero; Ya que ésta etapa es la más importante en el procesamiento del grano, debido a que a partir de éste se producen los cambios bioquímicos que dan origen a los precursores del aroma y sabor en la semilla y por ende en el chocolate que es el producto final del beneficiado de cacao. La fermentación para este tipo de cacao Forastero tiene una duración de 5 a 6 días; en la siguiente investigación se pretende disminuir el tiempo de fermentación haciendo uso de inóculos con levaduras de cerveza *Saccharomyces cerevisiae* para medir su mejora y compararlo con los procesos tradicionales de fermentación.

Capítulo II

2.1 Revisión de literatura

2.1.1 La fermentación.

Es un proceso que ocurre en dos etapas y en dos lugares:

- a) Fermentación de los azúcares de la pulpa que cubren los granos. Los azúcares se transforman en alcohol y luego en ácido acético (similar a la fermentación de la uva para producir vino y vinagre)
- b) Ácido acético, producido externamente, penetra a través de la cáscara y produce reacciones bioquímicas en el grano que son las responsables de la formación de los precursores del sabor a chocolate.

2.1.2 La fermentación de los azúcares de la pulpa.

Causado por una sucesión microbiana (levadura, bacterias de ácido láctico, acetobácter)

1. Fase anaeróbica –primeras 48 horas (la pulpa no permite la circulación de aire)
 - Fermentación de la levadura –azúcar en la pulpa se transforma en alcohol –etanol
 - Aumenta la temperatura –reacción exotérmica
 - Formación de ácido láctico

Figura No 9. Mazorca de Cacao Tipo Forastero. Cortada transversalmente. Fuente Hacienda La Carrera, Usulután, Dep. De El Salvador. C. A.

- La pulpa que deshace –se escurre –penetra aire
 - Composición de la pulpa: Agua 82-87%, Azúcares 10-13%, Pentosán 2-3%, Ácido Cítrico 1-2%, Sales 8-10%
2. Fase aeróbica –día 3 en adelante.
- Aireación (La pulpa se escurre y se voltea la masa luego de 48 horas) permite el crecimiento de bacterias acetobacter.
 - Acetobacter transforma el alcohol en el ácido acético.
 - Se produce una reacción exotérmica y aumenta la temperatura hasta 50°C
 - Ácido acético penetra el grano y produce cambios que forman Isoprecusores del sabor a chocolate.

SUCESIÓN MICROBIANA EN LA FERMENTACIÓN DE LA PULPA

Log UFC

2.1.3 IMPORTANCIA DE LA FERMENTACIÓN DEL CACAO

Días de fermentación

Figura No 10. Grafico de sucesión en la Fermentación en el Cacao. Las líneas de color rosa, corresponde a levaduras, las líneas de color amarillo lacto bacilos, color magenta bacilos, línea azul acetobacter. Fuente: Smilja Lambert, Mars, Inc. Fermentación del Cacao.

2.1.3 IMPORTANCIA DE LA FERMENTACIÓN DEL CACAO

No hay sabor a chocolate en los granos sin fermentar.

Durante la fermentación se forma compuestos (precursores del sabor a chocolate) que reaccionarán entre ellos durante el tostado para formar el sabor a chocolate.

- El sabor a Chocolate se forma en dos etapas
- Fermentación: se forman los precursores del sabor
- Tostado: esos precursores reaccionan, formando el sabor a chocolate.

APARIENCIA EXTERNA DE LOS GRANOS ANTES, DURANTE Y DESPUES DE LA FERMENTACIÓN



Figura No. 11 Fotografías granos de cacao 1ª día (semillas frescas), 2 días y 5 días de fermentado. Fuente: Smilja Lambert, Mars, Inc. Fermentación del Cacao.

2.1.4 CAMBIOS INTERNOS EN LOS GRANOS DURANTE LA FERMENTACIÓN

- Ácido acético penetra el grano a través de la cáscara.
- Alta temperatura y efecto del ácido:
- Muerte del grano
- Se interrumpe la estructura molecular interna

Figura No. 12 Fotografías granos de cacao Fermentado. Fuente: Smilja Lambert, Mars, Inc. Fermentación del Cacao.

2.1.5 CAMBIOS INTERNOS EN LOS GRANOS DURANTE LA FERMENTACIÓN

Los granos de cacao están compuestos por células blancas (grasa/manteca, proteínas) y células moradas (polifenoles).

- Alta temperatura y efecto del ácido interrumpen la estructura molecular interna
- A causa de ésta interrupción, los compuestos del grano se mezclan y reaccionan entre ellos.
- Reacciones entre proteínas, enzimas y polifenoles son cruciales para la formación de los precursores del sabor a chocolate.

2.1.6 FIN DE LA FERMENTACIÓN –COMIENZO DEL SECADO

El tiempo de fermentación es normalmente:

- Forastero 5-7 días
- Criollo 2-3 días
- Trinitario 6-7 días
- Estructura interna abierta con centro y exterior color café (marrón)
- Temperatura comienza a bajar

Con menores temperaturas las bacterias de la putrefacción proliferan y mayor fermentación produce un “olor a jamón” típico de cacao sobre fermentado.

2.1.7 SECADO DE GRANOS FERMENTADOS

- Reducción de la humedad de 45% a 7%
- Granos de cacao listos para ser transportados
- Continuación del proceso de fermentación
- Mientras el grano esté húmedo, se siguen formando las reacciones que generan sabores.
- Fuerte reacción “café (marrón)” –oxidación de polifenoles-con reducción de sabores amargos y astringentes.
- Secado solar es preferible para mejor calidad
- Secado mecánico no es recomendado

- Más caro.
- Peligro de contaminación por humo.
- Retiene sabores ácidos.

2.1.8 IMPORTANCIA DEL SECADO SOLAR

- Es la mejor forma para alcanzar alta calidad
- Significativa disminución de sabores amargos y ácidos:
- Se evapora el ácido acético –volátil -a través de la cáscara
- Durante un secado lento, los ácidos no volátiles –ácido láctico –es parcialmente transportado por el agua hacia la cáscara.
- Fuerte oxidación –color café de los polifenoles–produce menor astringencia y amargor.
- Continúa la formación de sabores.

2.1.9 FACTORES QUE INFLUYEN LA FERMENTACIÓN

- Madurez de las mazorcas
- Almacenamiento de la mazorcas
- Cantidad de granos
- Cantidad de pulpa
- Tipo de cacao
- Duración de la fermentación

- Volteos
- Efectos climáticos
- Enfermedades

2.1.10 CONDICIONES CRÍTICAS PARA PRODUCIR GRANOS BIEN FERMENTADOS

- Mazorcas maduras en suficiente cantidad (mínimo 50 –100 kg de grano en baba)
- Poca pulpa para favorecer baja acidez y mejor sabor
- Secado solar asegurará:
 - Menor acidez
 - Menor astringencia y amargor
 - Mejor sabor a chocolate
- El sabor final del chocolate depende de factores genéticos del material sembrado.

2.1.11 UNA BUENA FERMENTACIÓN NO ES SUFICIENTE PARA UN BUEN CHOCOLATE

- Siguiendo el siguiente paso para un buen sabor a chocolate es un buen tostado.



Figura No. 13 Fotografías granos de cacao secos y sus productos.
Fuente: Smilja Lambert, Mars, Inc. Fermentación del Cacao.

- El sabor a chocolate nunca fue planificado por la naturaleza.
- De hecho, es el resultado de la muerte del grano de cacao y las reacciones de la posterior destrucción de la estructura interna.
- El sabor a chocolate es una mezcla extremadamente compleja de más de 500 compuestos.
- A medida que los procesos analíticos mejoran, aumentan la cantidad de compuestos identificados.

Figura No. 14 diferentes tipos de confites de Chocolate. Fuente: Smilja Lambert, Mars, Inc. Fermentación del Cacao.

No existe un buen sustituto artificial del sabor a chocolate.

2.2 Descripción de los medios de cultivo para las siembras microbiológicas.

2.2.1 MEDIO DE ÁCIDO ACÉTICO-ETANOL RUTHERFORD (RAE)

Este medio de cultivo, contiene los componentes necesarios para el observar el crecimiento de bacterias acéticas. Junto con los elementos de Peptona, Glucosa, Fosfato Sódico, Agar y Ácido Cítrico evitan el crecimiento de otros microorganismos, lo que lo convierte en un medio selectivo muy particular.

2.2.3 AGAR MRS

A menudo abreviado como MRS, éste tipo de medio de crecimiento bacteriano se llama así por sus inventores: Man, Rogosa y Sharpe. Desarrollado en 1960, éste medio fue diseñado para favorecer el crecimiento exuberante de lactobacilos para el estudio de laboratorio. Contiene acetato de sodio, que suprime el crecimiento de muchas bacterias competidoras (aunque algunos Lactobacillales otros, como Leuconostoc y Pediococcus, pueden crecer). Este medio tiene un color marrón claro.

2.2.4 AGAR ESTÁNDAR

El Agar Estándar es un medio utilizado para el recuento de bacterias aeróbicas a partir de agua, aguas residuales, alimentos y productos lácteos. Este medio también es conocido como Agar Cuenta Estándar. El Agar Métodos Estándar fue desarrollado por Buchbinder

Baris and Goldstein en 1953 como un requerimiento de la American Public Health Association. Éste medio se formula con los ingredientes originales.

2.2.5 PDA

Tiene en su formulación dextrosa como fuente carbonada, éste compuesto lo hace selectivo para hongos ya que sólo éstos pueden degradarlo.

2.3 Antecedentes

La tesis elaborada por Denys H. Gustavo (1962) sobre el cultivo del cacao y algunos trabajos y observaciones, menciona sobre la cultura cacaotera en todo el mundo, además de exponer sobre la historia del chocolate en el país y hacer mención del departamento de Sonsonate como cosechador de uno de los mejores chocolates del mundo. El autor destaca en su investigación, los diferentes tipos de árboles así como las distintas fincas, y zonas salvadoreñas que fueron nichos de cacaoteros. En las cuales menciona La Hacienda Santa Emilia dónde se obtenía la mayor cantidad de cacao criollo, ubicada en Sonsonate y sus alrededores, así como San Pedro Nonualco (La Paz) donde se sembraba semillas provenientes de México, La Hacienda La Carrera e Isla del Espíritu Santo, ambas ubicadas en el Departamento de Usulután, dónde se cosechaba cacao del tipo calabacillo y amelonado.

La tesis elaborada por Adriana M. Marroquín (2011) sobre el estudio agromorfológico y fisicoquímicos de ecotipos se destaca en la búsqueda y clasificación de las diferentes accesiones que se encuentran el país, a través de una caracterización agromorfológica realizada en el departamento de Usulután, realizándole a las semillas de las mazorcas exámenes físico- químicos para determinar su porcentaje de ceniza, proteínas, humedad, calorías y grasa.

La tesis elaborada por Belky I. Arenivar y Carmen E. Gutiérrez (2009) sobre el diseño de estrategia para mejora de proceso de industrialización y diversificación de productos de cacao se diseñó una estrategia para mejorar los procesos de obtención y diversificación de los productos de cacao en la Hacienda “La Carrera” con el objeto de mejorar su

rentabilidad y preservar el cultivo. Se realizó un estudio de mercado para determinar cuáles son los de cacao que tienen más demanda a nivel local y se determinó la factibilidad técnica de su elaboración; También se realizó una investigación que permitió identificar los principales productos derivados del cacao que tienen más demanda en el mercado local así como los principales consumidores. Para ello se realizó un estudio de mercado y una investigación metodológica de tipo bibliográfica y de campo.

La tesis elaborada por Rodrigo A. Ramírez sobre estudio agromorfológico y físico-químico de ecotipos de cacao cultivados en los municipios: Candelaria de la Frontera, Ciudad Arce, Coatepeque, Huizúcar, Jayaque y el Paisanal se destaca en trazar un mapa con algunos productores de cacao en los municipios antes mencionados, para determinar que variedades se encontraron en base a las muestras seleccionadas para analizarse. Específicamente identificar especies acriolladas y dónde se encontraron mayor cantidad de frutos acriollados

Capítulo III

3.1 Metodología.

En el siguiente proceso de investigación, se aplicó la siguiente metodología: en la primera fase se realizó visitas periódicas de campo, con el fin de identificar y determinar las características del tipo de cacao Forasteros, en la que se conocieron todos los aspectos agromorfológicos del fruto del cacao Forastero; para lograr ésta actividad se deberá adoptar los parámetros de medición descritos por : Castaneda, Bonilla y Pérez (2012), Las mazorca que se recolectaron se trasladaron al laboratorio de biotecnología de CENSALUD de la Universidad Nacional de El Salvador, éstas se cortaron con un cuchillo con el objetivo de extraer las semillas con mucílago (ricas en carbohidratos), que se encuentran unidas a una placenta fibrosa, aquí se tendrá mucho cuidado de ir colocando el material identificado en las cajas de madera (3) y plástico (3), utilizando un volumen de masa de 2kg por cada ensayo. Se realizó análisis de porcentaje de azúcar a la pulpa blanca (mucílago) que tiene la semilla y partiendo de éste resultado se calculará y establecerá el porcentaje de azúcar necesario para iniciar la fermentación (21%), Las mezclas serán combinadas en una proporción de 1-1 semilla y agua; (un kg de masa de semillas por un kg de agua) la cual será preparada con una solución azucarada de sacarosa la cuál será ajustada para lograr obtener un 21%. (Anexo No 1).

Después de haber calculado la concentración adecuada de azúcar se pasará al siguiente proceso, el cuál consiste en la inoculación de levaduras del género *Saccharomyces cerevisiae* (comúnmente utilizada para la panificación) la cantidad a utilizar es de 0.05 a 1%, éste proceso se realizará con el objetivo de acelerar el proceso fermentativo. El tiempo de actividad de la levadura en el proceso fermentativo será de 5 a 6 días tiempo

que las levaduras cumplen su crecimiento en condiciones adecuados y tradicionales (cajón de madera), y de acuerdo al punto de su etapa de fermentación; se medirá el desprendimiento de la porción mucilaginoso que envuelve la semilla de cacao (son los azúcares que están alrededor de las semillas). Las semillas se deberán ir agitando desde el inicio y cada 24 horas. (Anexo No 1)

A partir de ese momento se evaluarán los siguientes factores como: Temperatura, pH, porcentaje de Azúcar y acidez, éste será durante el proceso de fermentativo, y para los análisis bromatológicos que serán antes y después de su evaluación se deberá adoptar por las normas de análisis de la AOAC (Asociación Oficial de Químicos Agrícolas), específicamente en los análisis de: % Proteína (Nº 970,20), % grasa (Nº 972.15), % humedad (Nº 931.04); % fibra, pH (Nº 970,21) y % de acidez titulable (Nº 942,15). Así como se medirá el peso inicial y final para determinar el factor de ganancia de peso de los granos y el factor de medición de los cambios de volumen. Estos parámetros nos indicarán cuáles son los factores que caracterizan los cacaos Forastero.

En el análisis microbiológico se desarrollará a partir de una solución madre que se disolverá de 10⁻¹ hasta 10⁻⁸, sembrándose 20 µl por triplicado de cada dilución en tres medios de cultivo selectivos diferentes y las tomas de muestras serán de acuerdo a las etapas biológicas que se llevan a cabo en el proceso fermentativo de cacao. A cada tiempo corresponderá el empleo de **24** cajas de Petri, sembrándose en cada caja cuatro puntos de dilución (Anexo No 1), los medios propuestos de cultivo a utilizar serán :

1. **PBA** medio propuesto para el crecimiento de bacterias acéticas
2. **MRS** para el desarrollo de bacterias lácticas
3. **PCA** para el conteo total de microorganismos (Anexo).

3.2 Método tradicional en cajas de madera y no tradicional en recipientes plástico.

Para la realización de ésta prueba se necesitó realizar cajas de madera que no despidieran sabores ni olores fuertes, y que según su diseño permitieran el escurrido de la babas del mucílago, las cuales irían desprendiendo en el proceso de fermentación; por lo que se decidió utilizar madera de Laurel, la cuál es una de las que cumplen con dicho parámetro. Para el caso de la prueba en recipientes plásticos, éstos deberían de ser de materiales que no tuviesen olores fuertes. Los análisis fisicoquímicos se realizaron para ambos métodos (tradicional y el propuesto en la investigación) (Anexo No 1)

3.2.1 Recolección de las muestras.

Las mazorcas se recolectaron en la Hacienda La Carrera, ubicada en el departamento de Usulután, se transportaron hasta la Universidad Nacional que el lugar donde se realizó el proceso de análisis.

3.2.2 Preparación de las muestras (Anexo No 1)

Antes de iniciar el proceso de evaluación se realizó actividades como cortes y pesadas de las muestras.

3.2.3 Pesado de las mazorcas

Materiales y equipo

- Recipiente plástico (utilizado como tara)

- Balanza digital marca METTLER TOLEDO

Procedimiento

- Primeramente se realizó el pesado de las mazorcas, ésto se realizó utilizando una balanza digital con capacidad de 1500 gramos.
- Se realizaron varias pesadas hasta terminar de pesar todas las mazorcas.
- Se anotaron cada una de las pesadas y fué hasta el final que se realizó la suma del total de muestra recolectada.

3.2.4 Extracción de las semillas

Materiales y equipo

- Recipiente plástico
- Cuchillo grande
- Balanza digital marca METTLER TOLEDO

Procedimiento

- Se realizó corte de cada una de las mazorcas, teniendo el cuidado de no dañar las semillas con el filo del cuchillo.
- Después de haber cortado las mazorcas se retiró todas las semillas y se agregaron en recipientes de plástico.

- Habiendo obtenido todas las semillas, se pesaron para sacar el peso real de semillas sin la mazorca, para ésta actividad fué necesario destarar en el equipo, presionando la tecla “O/T” la cuál hacia el auto cero en la balanza.
- Se realizaron varias pesadas hasta obtener el total de semillas pesadas, al final se realizo la suma del total de muestra recolectada.
- El peso total de semillas obtenidas para el método tradicional pesado fue de: 12686.5 g (27.94 lb), las cuales se dividieron en tres cajas a, b y c, en las cantidades de 4222.4 g, 42299.9 g y 4234.2 g, respectivamente.
- El peso total de semillas obtenidas para el método no tradicional pesado fue de: 1232.37g (2.71 lb), las cuáles se dividieron en tres recipientes, en partes aproximadamente iguales.

3.2.5 Medición de diámetro de las semillas

Materiales y equipo

- Pie de Rey digital (calibrador)

Procedimiento

- Se seleccionaron al azar 10 semillas para medir sus diámetros
- Se activó el calibrador (Pie de Rey) y se ajustó a cero, esta actividad se hizo, topando las puntas de calibrador, y presionando la tecla “cero”.
- Se realizó medición de ancho y largo de las 10 semillas, anotando cada uno de los datos.

3.3 **Preparación de cajas para el proceso de fermentación**

Materiales y equipo

- Cajas de madera
- Recipientes de plástico
- Hojas de huerta frescas
- Sacos de yute o nylon
- Papel aluminio

Procedimiento

- Se colocaron las cajas marcando a, b, c; a cada una según correspondiera, esto con el fin de lograr una identificación en el proceso de análisis. Se dosificó las semillas en las cajas de madera y plástico en partes iguales
- A las cajas de madera se les colocó como tapadera las hojas de huerta de banano (estas estarían en contacto directo con las semillas, y sobre esto se colocarían los sacos, para mantener más protegidas las semillas y permitir mayor calor en el proceso de fermentación.
- Para el proceso de fermentación en los recipientes plásticos se marcaron los recipientes con identificación a, b, c; además se realizó previamente el siguiente proceso de mezclado:
- Se midió agua en la relación 1:1 semilla-agua. Para éste caso como se obtuvo 2.71 lb (1232.37 gramos) de semillas, se necesitaría 2.71 lb de agua. Para éste caso se agregó 2464 g de agua, considerando que se deberían ajustar los grados Brix, a 21 grados.

- Se pesó el 0.50% de levaduras. Para éste caso se peso 0.0136 libras de levadura, equivalente a 6.16g.
- La relación de azúcar: para 1 litro de agua – 200 gramos de azúcar. Para éste caso se agregó 492.8 gramos de azúcar. Hasta ajustar a 21 grados Brix, al final se dosifico 517 gramos de azúcar.
- Se realizó mezcla de todos los ingredientes, y se depositaron en los depósitos de plástico.

3.4 Análisis físico químico. (Anexo No 1)

3.4.1 Medición de pH

Materiales y equipo

- Tiras de pH marca Merk
- Potenciómetro digital marca Orión 410 A
- Papel descartable
- Agua destilada
- Soluciones Búfer pH-4 y pH-7 marca orión.

Procedimiento

- Se realizó ajuste de equipo pH-chimetro digital con soluciones búfer pH-4 y pH-7. ésto se realizó enjuagando el electrodo con agua destilada y secando con papel descartable.

- Se ajustó primeramente con búfer pH-7 y posteriormente con pH-4; presionando la tecla “mode” y posteriormente “yes”, cuando el equipo dá alarma que ha leído la solución búfer, se presiona nuevamente la tecla “yes”. Cuando el equipo indica nuevamente con la alarma, se presiona la tecla “yes”, el equipo indicará en la pantalla la curva de eficiencia este debe de ser mayor a 94% de eficiencia.
- En caso que no se cumpla con el parámetro de calibración, se debe de cambiar la solución búfer o en casos extremos el electrodo.
- Cuando el equipo está listo con la calibración/ajuste con las soluciones búfer, se inicia la medición de las muestras. Cuando las muestras son acuosas y se puede sumergir el electrodo no se realiza preparación de la muestra; en el caso de las muestras secas se debe de preparar la muestra con agua destilada para poder hacer la medición del pH, éste último procedimiento se aplicó para las cajas de madera, ya que en la mayoría de los casos la muestra se debía agregar agua y disolver la pasta de las semillas de cacao. Esto se realizó pesando 2 gramos de mucílago de las semillas y adicionando 5 ml de agua, con esto se podía sumergir el electrodo en la muestra preparada.
- Cada vez que se realizaba nueva medición de muestra, se realizaba enjuague del electrodo con agua destilada.

3.4.2 Medición de temperatura.

Equipo

- Termómetro digital marca Traceable.

Procedimiento.

- Activar el termómetro, introducirlo en las semillas y esperar que la lectura se estabilice.
- Se anotó el resultado de cada una de las muestras analizadas.

3.4.3 Determinación de % de alcohol.

Equipo

- Refractómetro Pocket marca ATAGO. (Para porcentaje de alcohol)
- Agua destilada
- Papel desechable.

Procedimiento de análisis.

- Se enjuagó con agua destilada el prisma y se secó con papel suave desechable.
- Se realizó auto cero con agua destilada, esta operación se realizó, agregando agua cubriendo el prisma del equipo, y presionando la tecla “autocero”.
- El equipo indicará en la pantalla cero, ya está listo para hacer lecturas en las muestras.
- Para leer el contenido de alcohol en porcentaje, sólo se dosificaba un poco de muestra en el prisma hasta que este se cubriera, se presionó la tecla “Start”, el resultado se observó en la pantalla. Se anotó el resultado.

3.4.4 Medición de porcentual de ácido acético

Equipo

- Refractómetro Pocket marca ATAGO. (Para porcentaje de ácido acético)
- Agua destilada
- Papel desechable.

Procedimiento de análisis.

- Se enjuagó con agua destilada el prisma y se secó con papel suave desechable.
- Se realizó auto cero con agua destilada, esta operación se realizó, agregando agua cubriendo el prisma del equipo, y presionando la tecla “autocero”.
- El equipo indicara án la pantalla cero, ya está listo para hacer lecturas en las muestras.
- Para leer el contenido de ácido acético en porcentaje, sólo se dosificaba un poco de muestra en el prisma hasta que éste se cubriera, se presionó la tecla “Start”, el resultado se observó en la pantalla. Se anotó el resultado.

3.4.5 Medición de grados Brix

Equipo

- Refractómetro Pocket marca ATAGO. (Para grados Brix)
- Agua destilada
- Papel desechable.

Procedimiento de análisis.

- Se enjuagó con agua destilada el prisma y se secó con papel suave desechable.
- Se realizó auto cero con agua destilada, esta operación se realizó, agregando agua cubriendo el prisma del equipo, y presionando la tecla “autocero”.
- El equipo indicará en la pantalla cero, ya está listo para hacer lecturas en las muestras.
- Para leer el contenido de grados Brix, sólo se dosificaba un poco de muestra en el prisma hasta que éste se cubriera, posteriormente se presionó la tecla “Start”, el resultado se observó en la pantalla. Se anotó el resultado.
- Después de haber obtenido el resultado se ajustaba el Brix a 18°Bx.
- Después de realizar la evaluación se extraían 10 semillas al azar de cada uno de las cajas de madera y los recipientes de plástico, se cortaban por mitad para ir observando el proceso de fermentación de las semillas.

Nota: éstos procedimientos de análisis se realizaron en ambos métodos, (tradicional y no tradicional, por 6 días seguidos, teniendo en cuenta que en La Hacienda La Carrera se hace de esta manera.

3.5 Análisis microbiológico (Anexo No 1)

3.5.1 Preparación de medios de cultivo.

Materiales y equipo

- Frascos de vidrio Pirex de 250 mL
- Espátulas
- Balanza digital marca METTLER TOLEDO
- *Hot-plate con agitador*
- *Agitadores magnéticos*
- *Sobres para anaerobiosis marca Anaerocult*

- *Agar Estandar-1*
- *MRS*
- *Agar Patata Dextrosa.*
- *RAE*
- *Ácido acético*
- *Peptona*
- *Alcohol etílico*
- *Ácido cítrico*
- *Glucosa*
- *Extracto de levadura*
- *Fosfato Sódico*
- *Agar-Agar*
- *Micro pipeta marca Eppendorf*
- *Combitips de 5 mL marca Eppendorf*
- *Tubos de vidrio con rosca y tapa*
- *Gradilla para tubos*
- *Placas de Petri 90x15*
- *Cucharita de acero inoxidable de 20 mL*
- *Incubadoras con termostato digital y análogo*
- *Jeringas de 5 mL*
- *Tijeras*
- *Mecheros*
- *Autoclave digital marca Yamato.*
- *Fascos de acero inoxidable con tapaderas a presión.*
- *Cinta adhesiva*
- *Marcador*
- *Agua destilada*
- *Contador de colonias digital*
- *Bolsas estériles Whirl-pack 8 oz*

3.5.2 Preparación de RAE

- se realizó cálculo de formulación de cada uno de los ingredientes para una preparación de 150 ml de medio de cultivo.

- Se peso 6 g de Glucosa, 1.5 g de extracto de levadura, 1.5 g de Peptona, 0.51 g de Fosfato Sódico, 0.23 g de Acido Cítrico, 3 ml de Etanol, 1.5 ml de Ácido Acético, 1.5 g de Agar-Agar.
- Se mezclaron todos los ingrediente, excepto el alcohol, y el Ácido Acético, éstos se dosificaron hasta que el medio ya estaba esterilizado, pero aún caliente.
- Para la dosificación de los ingredientes líquidos antes mencionados se utilizó un filtro estéril, para jeringas.
- Se etiqueto el frasco.

3.5.3 Preparación de medio de cultivo MRS

- se realizo cálculo para preparar 150 gramos de medio de cultivo. Esto se realizo según formula del medio: 52.2 gramos para 1000 mL . entonces se multiplico 150 ml a preparar por 52.2 g (según fórmula) y se dividió entre 1000 mL, obteniendo de esta forma los 7.83 g a pesar para preparar 150 mL de medio de cultivo.
- Adicionalmente se peso 1.5 gramos de Agar-Agar, para mezclarlos, y mejorar la verificación del medio.
- Se deposito en un Erlenmeyer con tapa de rosca, se agregó el agua hasta la marca de 150 mL y se calentó hasta observar la incorporación del medio.
- Posteriormente se esterilizo en autoclave. Se etiquetó.

3.5.4 Preparación de Agar Estándar.

- se calculó la cantidad a pesar para preparar 150 ml de medio de cultivo, evaluando la fórmula de la etiqueta que indica que para preparar 1000 ml de medio se necesita pesar 37 g.

Ejemplo:

37 g de medio ---1000 ml

X gramos --- 150 ml

$$X = 150 \times 37 / 1000$$

$$X = 5.55 \text{ g de medio para } 150 \text{ mL.}$$

3.5.5 Preparación de Agar Patata Dextrosa.

- se calculó la cantidad a pesar para preparar 150 ml de medio de cultivo, evaluando la fórmula de la etiqueta que indica que para preparar 1000 ml de medio se necesita pesar x g.

Ejemplo:

g de medio ---1000 ml

X gramos --- 150 ml

$$X = 150 \times \quad / 1000$$

$$X = \quad \text{g de medio para } 150 \text{ ml.}$$

3.6 Siembra de muestras

- Los análisis a realizar son: recuento total de bacterias, hongos y levaduras, bacterias acéticas, bacterias ácido lácticas.
- Primera mente se extraen unas 6 semillas de cada caja depositándolas en bolsas estériles Whirl Pack e identificándolas, para ésta actividad se colocaron guantes y mascarilla.
- Se realizó dilución a la 0.0001 de las muestras antes de realizar la siembra.
- Este proceso se realizó con una balanza y micro pipeta, primero se peso 1 gramo de muestra en 10 ml de agua estéril. La dilución inicia 0.1ml.
- Posteriormente se pipeteó 1 ml y se dosificó en otro tubo que contenía 10 ml de agua estéril; la dilución ya estaba a 0.01; se pipeteó de esta manera hasta llegar a dilución de 0.0001ml de muestra.
- De la dilución final se extrajo 1 ml para siembra en placas de Petri 90 X 15 descartables, por duplicado, para cada uno de las determinaciones microbiológicas indicadas en el literal 2.1.1
- Se pipetearon en las cajas de Petri previamente marcadas en los que incluyó: caja (a, b y c), medio de cultivo, fecha de siembra.
- Después de haber realizado las siembras de las muestras, se dosificó 20 ml de medio de cultivo de acuerdo a cada determinación e indicada en las cajas de Petri; para ésto se utilizó una cuchara de acero inoxidable previamente esterilizada con alcohol y flameada con mechero.

- Después de haber dosificado el medio de cultivo se realizó movimientos en círculo formando un 8, para homogenizar el medio de cultivo y la alícuota de muestra, de tal forma que quedará en toda la placa dispersa la muestra.
- Es importante mencionar que en la dosificación del medio de cultivo, se realizó uno a la vez para después limpiar y sanear nuevamente la cuchara y no contaminar con medio de cultivo las otras placas.
- Después de haber terminado la dosificación de medio y homogenizado de todas las muestras, se esperó unos 15 minutos hasta que el medio ya estuviese sólido.
- La incubación para RAE y MRS se utilizó sobres de anaerobiosis, con el fin de evitar la presencia de oxígeno, por ser bacterias anaerobias las que se están determinando con estos medios de cultivo; las incubaciones se realizaron de la siguiente manera:
- En las placas marcadas con RAE, MRS, se incubaron a $45^{\circ} \pm 2^{\circ}\text{C}$, las de Estándar-1 a $37^{\circ} \pm 2^{\circ}\text{C}$ y las de PDA a temperatura ambiente ($25^{\circ} \pm 2^{\circ}\text{C}$).
- Las lecturas se realizaron de la siguiente manera: para bacterias Acéticas, ácido láctico y Recuento Total, se leían a las 48 horas; para hongos y levaduras hasta los 7 días.
- Las lecturas se realizaron con un contador de colonias de la siguiente manera: si el crecimiento era muy numeroso, se utilizaban las cuadrículas más pequeñas, este resultado se multiplicaba por 9 corresponde al número de cuadrículas en un cuadro grande y después por 54 que es la cantidad de cuadros que caben en una caja de Petri de 90 X 15. Después se potencia a la dilución efectuada, para obtener el conteo total de unidades formadoras de colonias.

Capítulo IV

4.1 Discusión de resultados

4.1.1 RESULTADOS FÍSICO-QUÍMICOS

4.1.2 METODO TRADICIONAL

Medición de semillas.

Se seleccionaron al azar 10 semillas y se realizó medición de las semillas con Pie de Rey digital.

Tabla de diámetro de semilla pelada sin fermentar método tradicional		
No semillas	Largo (pulgadas)	Ancho (pulgadas)
1	1.094	0.62
2	1.147	0.66
3	1.075	0.588
4	1.033	0.675
5	1.142	0.638
6	0.999	0.530
7	0.972	0.536
8	1.023	0.522
9	1.100	1.677
10	1.126	0.562
Suma	10.711	7.006
promedio	1.0711	0.7006
Desviación estándar	0.0614	0.347

Tabla 1. Medidas de semillas MT (método tradicional)

Los resultados de las medidas de las semillas nos demuestran el tamaño en general que se ha obtenido de cada una de ellas para realizar la prueba las cuales están en un promedio de 1.0711 pul. una desviación estándar 0.0614 pul. en el largo de las semillas. Respecto al ancho de las semillas se obtuvo un promedio de 0.701 pulgadas y 0.347 pulgadas en la desviación estándar. Por lo que no es mucha la diferencia en las medidas. Si descartáramos las semillas 6 y 7 de la tabla, nuestra desviación y promedios serían mejores.

Cuadro de resultados fisicoquímicos en el proceso de fermentación tradicional.

Tabla 2. Resultados fisicoquímicos. MT día 1.

DIA 1			
12/06/2012			
PARÁMETRO	CAJA A	CAJA B	CAJA C
pH	4	4	4
Temperatura	29.9	30.5	30.5
°Brix	13.7	8.4	13.6
% Alcohol	0.6	0.8	0.87
% de Ácido Acético	0.34	0.33	0.35

En la tabla se muestran los resultados fisicoquímicos del método tradicional, en el cuál, los resultados aún no representan mayor cambio, por ser las primeras 24 horas de fermentación.

Tabla 3. Resultados fisicoquímicos. MT día 2.

DIA 2			
13/06/2012			
PARÁMETRO	CAJA A	CAJA B	CAJA C
Ph	4	4	4
Temperatura	30.5	32.8	32.5
°Brix	13.6	6.3	7.1
% Alcohol	2.6	3.1	2.8
% de Ácido Acético	0.8	1.6	1.9

En la tabla se muestran los resultados fisicoquímicos del método tradicional, en el cual, los resultados después de 48 horas, reflejan disminución de grados Brix, el pH aún no representan mayor cambio, y se observa aumento en ácido acético y producción de alcohol.

Tabla 4. Resultados fisicoquímicos . MT día 3.

DIA 3			
14/06/2012			
PARÁMETRO	CAJA A	CAJA B	CAJA C
pH	4	4	4
Temperatura	31.6	33.5	32.1
°Brix	6.6	6.7	6.9
% Alcohol	6.7	8.4	9.5
% de Ácido Acético	2.6	4.6	3.6

En la tabla se muestran los resultados fisicoquímicos del método tradicional, se puede observar un aumento en ácidos en el que se incluye el acético y disminución de alcoholes; las probabilidades de obtener cacao más ácido aumentan.

Tabla 5. Resultados fisicoquímicos. MT día 4.

DIA 4			
15/06/2012			
PARÁMETRO	CAJA A	CAJA B	CAJA C
Ph	4.25	4.08	4.22
Temperatura	31.2	33.1	32
°Brix	6.6	6.4	6.6
% Alcohol	5.7	6.4	7.5
% de Ácido Acético	5.3	9.6	8.6

En ésta tabla se puede observar en los resultados método tradicional, que va en acelerado la producción de ácidos previendo el medio adecuado para la formación de bacterias acidas, evitando que las levaduras se mantengan y permitiendo su extinción, además de la baja cantidad de azúcares revelada en la prueba de grados Brix.

Tabla 6. Resultados fisicoquímicos. MT día 5.

DIA 5			
16/06/2012			
PARAMETRO	CAJA A	CAJA B	CAJA C
pH	4.26	4.3	4.4
Temperatura	31.5	33.9	33.4
°Brix	6.5	4.4	6.5
% Alcohol	3.8	4.1	6.3
% de Ácido Acético	7.3	10.1	9.1

En la tabla se puede apreciar leve cambio en el pH, pero no es significativa aún con la presencia de ácidos acético; el brix a disminuído muy poco, continúa creciendo los ácidos y disminuyendo los alcoholes. Por lo que la fermentación seria más larga por la poca presencia de levaduras. Este día se ha cumplido 120 horas de fermentación.

Tabla 7. Resultados fisicoquímicos. MT día 6.

DIA 6			
16/06/2012			
PARÁMETRO	CAJA A	CAJA B	CAJA C
pH	4.29	4.36	4.49
Temperatura	31.4	33.8	33.4
°Brix	6.4	6.0	6.4
% Alcohol	2.2	3.5	3.1
% de Ácido Acético	9.9	12.2	11.2

En la tabla se puede observar que la temperatura se mantiene, pero no alcanza los niveles esperados, el ; ácido ha aumentado significativamente, cumpliendo éste día 6 días de fermentación(144 horas); manteniendo un medio adecuado para proliferación de bacterias ácidas, y el alcohol ha disminuido muy notablemente, lo que sería un indicador de la poca actividad biológica de las levaduras.

4.2 MÉTODO NO TRADICIONAL

Medición de semillas. Se realizó medición de las semillas con Pie de Rey digital.

Tabla 8. Medidas de semillas MNT (Método No Tradicional)

Tabla de diámetro de semilla pelada sin fermentar método no tradicional		
No. semillas	Largo (pulgadas)	Ancho (pulgadas)
1	1.063	0.565
2	0.94	0.526
3	1.122	0.576
4	1.035	0.617
5	1.000	0.576
6	1.18	0.591
7	1.19	0.540
8	1.049	0.603
9	1.145	0.615
10	1.106	0.563
Suma	10.830	5.771
promedio	1.083	0.577
Desviación estándar	0.080	0.030

Los resultados de las medidas de las semillas nos demuestran el tamaño en general que se ha obtenido de cada una de ellas para realizar la prueba las cuales están en un promedio de 1.083 pulg. una desviación estándar 0.080 pulg. En el largo de las semillas. Respecto al ancho de las semillas se obtuvo un promedio de 0.577 pulg y 0.03 pulg en la desviación estándar. Por lo que no es mucha la diferencia en las medidas. Si descartáramos las semillas 2 de la tabla, nuestra desviación y promedios serían mejores.

Cuadro de resultados fisicoquímicos en el proceso de fermentación no tradicional

Tabla 9. Resultados fisicoquímicos MNT (Método No Tradicional) Día 1.

DIA 1						
23/05/2012						
PARÁMETRO	CAJA A		CAJA B		CAJA C	
		Mas Azúcar		Mas Azúcar		Mas Azúcar
pH	3		3		3	
Temperatura	22.7		22.1		22.7	
°Brix	13.5	18.9	15.9	24	14.1	19.7
% Alcohol	6.7		8.3		8.8	
% de Ácido Acético	0		0		0	

La tabla muestra los resultados fisicoquímicos obtenidos el primer día de análisis, resultados de las primeras 24 horas. Además, a la caja A se agregó 37.1 g de azúcar, caja B se agregó 37.0 g de azúcar y a la caja C se agregó 25.4 g de azúcar. El pH, no ha cambiado aún la temperatura se mantiene en las 3 cajas, el Brix, si ha cambiado. La casilla donde se indica “más azúcar” se coloca la cantidad de azúcar adicionada para brindar un buen crecimiento de levaduras, manteniendo con ésto una buena fermentación.

Tabla 10. Resultados fisicoquímicos MNT. Día 2.

DIA 2						
24/05/2012						
PARÁMETRO	CAJA A		CAJA B		CAJA C	
		Mas Azúcar		Mas Azúcar		Mas Azúcar
Ph	3.5		3.4		3.4	
Temperatura	38		38.1		38.2	
°Brix	14.5	19	14.6	18.4	14.7	18.6
% Alcohol	12.5		10		11.3	
% de Ácido Acético	11		14		13.2	

La tabla muestra los resultados fisicoquímicos obtenidos en el segundo día de fermentación, el pH a aumentado al dosificar azúcar, la temperatura a aumentado considerablemente comparado con el primer día de fermentación, indicando una buena actividad biológica de las levaduras, además ha disminuido considerablemente el Brix, por lo que se ha agregado azúcar en las siguientes proporciones: Caja A se agregó 20 g de azúcar, Caja B se agregó 13 g de azúcar, Caja C se agregó 13 g de azúcar; con esto se mantiene el Brix en los niveles deseados, evitando que las levaduras disminuyan y la fermentación sea más rápida y además evitando que exista una excesiva proliferación de bacterias ácidas.

Tabla 11. Resultados fisicoquímicos MNT. Día3.

DIA 3						
25/05/2012						
PARÁMETRO	CAJA A		CAJA B		CAJA C	
		Mas Azúcar		Mas Azúcar		Mas Azúcar
Ph	3		3		3	
Temperatura	22.7		22.6		22.1	
°Brix	13.5	18	14	18	14	19
% Alcohol	28		2.5		30.5	
% de Ácido Acético	0.8		1.2		2.8	

En la tabla se puede apreciar que según va la fermentación en el método tradicional los parámetros fisicoquímicos han cambiado en relación al pH, éste es menor a los datos obtenidos en el día anterior, por lo que es necesario agregar azúcar para aumentar el pH, y evitar crecimiento de bacterias ácidas, las cuales son favorecidas por el pH ácido. Por lo que se adicionó las siguientes cantidades de azúcar para mantener el Brix adecuado cercano para una buena fermentación: Caja A se agregó 22 g de azúcar, Caja B se agregó 30 g de azúcar, Caja C se agregó 15.4 g de azúcar

Tabla 12. Resultados fisicoquímicos MNT. Día 4.

DIA 4						
26/05/2012						
PARÁMETRO	CAJA A		CAJA B		CAJA C	
		Mas Azúcar		Mas Azúcar		Mas Azúcar
pH	4		4		4	
Temperatura	38		38		38.1	
°Brix	13.5	18.5	11.5	18	14.5	18.5
% Alcohol	10		9.3		9.7	
% de Ácido Acético	12		12		11.5	

En la tabla se observa que después de dosificar azúcar el pH ha aumentado, la temperatura también a aumentado, lo que nos indica que al aumentar el azúcar en la mezcla, la actividad biológica aumenta, pero el Brix ya disminuyó, por lo que es necesario agregar más azúcar: Caja A se agregó 17.5 g de azúcar, Caja B se agregó 27 g de azúcar, Caja C se agregó 15 g de azúcar. Aún con esto el ácido ha aumentado, pero predominan las levaduras por la actividad biológica mostrada en la temperatura y el cambio de Brix y el pH que se mantiene aún con esta acidez.

Tabla 13. Resultados fisicoquímicos MNT. Día 5.

DIA 5						
27/05/2012						
PARÁMETRO	CAJA A		CAJA B		CAJA C	
		Mas Azúcar		Mas Azúcar		Mas Azúcar
pH	6		5.5		5.8	
Temperatura	37.9		38.1		36.9	
°Brix	7.7	18.4	7.8	17.9	8	18.1
% Alcohol	12.5		13		10	
% de Ácido Acético	11.2		14.2		10.6	

En la tabla de resultados se puede observar que el pH se ha elevado después de haber agregado azúcar, brindando un medio adecuado para la proliferación de levaduras, teóricamente el pH óptimo para las levaduras es de 5 a 6. La temperatura se mantiene y el porcentaje alcohólico va relacionado al Brix, ya que la cantidad de azúcar gastada es baja y el % de alcohol también. Este es el último día que se dosifica azúcar para mantener la fermentación y cerrar el ciclo el día siguiente. Las cantidades dosificadas son las siguientes: Caja A se agregó 45.0g de azúcar, Caja B se agregó 47.0g de azúcar, Caja C se agregó 39.5g de azúcar; en la columna derecha se registra el valor de grados Brix al que llega después de la dosificación de azúcar.

4.3 RESULTADO MICROBIOLÓGICO

Tabla 14. Resultados en método tradicional.

METODO TRADICIONAL															
Dia 1			Dia 2			Dia 3			Dia 4			Dia 5			
12-jun			13-jun			14-jun			15-jun			16-jun			
CAJAS			CAJAS			CAJAS			CAJAS			CAJAS			
parametro	A	B	C	A	B	C	A	B	C	A	B	C	A	B	C
	UFC / 1mL														
RTB	12078	7687	6588	1378	7180	5890	192	3987	648	378	1296	324	250	976	234
H&L	4860	3402	378	270	324	378	120	154	122	122	80	100	68	78	60
Bact Aceticas	0	0	0	5	9	8	1512	1296	1566	112	118	132	48	118	30
Bact Lacticas	4	13	47	98	109	145	137	486	478	378	432	2430	656	798	2890

En Ésta tabla de resultados se registran los datos obtenidos de las siembras microbiológicas realizadas en el método de fermentación Tradicional, desde el día primer día hasta el quinto día de siembra; en ésta solo se registran los resultados de las lecturas una vez cumplidas las horas de incubación y la fecha de siembra, que sería el mismo para cada evaluación realizada; en estos resultados se encuentran, Recuento total de bacterias, hongos y levaduras, bacterias acetobacter, y bacterias ácido lácticas. En la tabla se puede observar un elevado crecimiento de bacterias indicadoras de suciedad, las cuales corresponden al RTB, pero que no ocasionan enfermedades a la salud. Las levaduras que serian las encargadas de realizar la fermentación alcohólica en el cacao, se muestra un crecimiento moderado al inicio de la fermentación, pero en el transcurso de los días estas van disminuyendo, lo que impide obtener una buena fermentación en los granos. El comportamiento de las bacterias acéticas, es diferente, en el principio de la fermentación no observa crecimiento pero éstas empiezan a aparecer en el segundo día, en el tercer día ya se ha reproducido de manera rápida pero partiendo del día 4 éstas vuelven a disminuir, esto se podría deber al poco alcohol producido por las levaduras, permitiendo que se desarrollen las bacterias ácido lácticas, las cuales son las que se mantiene hasta el final de la fermentación

Tabla 15. Resultados en método tradicional duplicado.

METODO TRADICIONAL															
Dia 1			Dia 2			Dia 3			Dia 4			Dia 5			
12-jun			13-jun			14-jun			15-jun			16-jun			
CAJAS			CAJAS			CAJAS			CAJAS			CAJAS			
parametro	A 2	B 2	C 2	A 2	B 2	C 2	A 2	B 2	C 2	A 2	B 2	C 2	A 2	B 2	C 2
	UFC / 1mL														
RTB	12100	7687	6588	1312	7180	5890	189	445	654	453	1296	389	264	1002	256
H&L	4843	2354	424	199	324	378	113	165	132	132	80	132	75	89	65
Bact Aceticas	0	0	0	6	13	9	1498	1256	1578	123	118	129	54	123	41
Bact Lacticas	3	2	9	98	109	145	145	437	456	432	412	2521	765	812	2921

La tabla muestra los resultados microbiológicos de las siembras por duplicado del método tradicional; el comportamiento de las bacterias es muy parecido a los de la primera tabla y siembra; por lo que los resultados obtenidos se pueden decir que son validados por mantenerse en los dos casos. Siempre existe buena cantidad de RTB, crecimiento considerable de hongos y levaduras que en poco tiempo se van disminuyendo, esto podría deberse a la poca cantidad de alimento disponible para poder reproducirse y así generar más células. Las bacterias acetobacter aparecen en el segundo día, y van en crecimiento pero al cuarto día se vé disminución, no así en las bacterias ácido lácticas las cuales si se pudo ver crecimiento desde el primer día y fué aumentando en el proceso de fermentación de las semillas.

Tabla 16. Resultados en MNT (Método no Tradicional).

METODO NO TRADICIONAL															
	Dia 1			Dia 2			Dia 3			Dia 4			Dia 5		
	12-jun			13-jun			14-jun			15-jun			16-jun		
	CAJAS			CAJAS			CAJAS			CAJAS			CAJAS		
parametro	A	B	C	A	B	C	A	B	C	A	B	C	A	B	C
	UFC / 1mL														
RTB	1890	1008	2097	1200	980	976	690	760	765	567	453	498	139	309	265
H&L	12402	13453	10938	14900	14501	12452	16870	16798	14365	16980	16989	16809	18960	17689	19011
Bact Aceticas	0	0	0	78	98	102	239	456	765	897	765	894	1209	1154	1325
Bact Lacticas	0	0	0	5	9	23	14	23	45	56	76	89	125	165	164

Los resultados observados en la tabla anterior corresponden a la fermentación de cacao método no tradicional (se realizó siembra por duplicado), en la tabla se puede observar datos muy interesantes, respecto al comportamiento microbiológico que interfiere directamente en el proceso de fermentación en los granos de cacao. En el primer día de siembra se logra observar que existe gran cantidad de Bacterias Heterotróficas, conocidas como Misofílicas y generalmente RTB (Recuento Total de Bacterias), pero que con el tiempo esto va disminuyendo; esto se puede deber al alcohol producido por las levaduras. En el caso de las levaduras se puede ver un crecimiento muy elevado en comparación al método tradicional, éste se debe a que en este caso se a inoculado levaduras a la mezcla de semillas, con el fin de acelerar el proceso de fermentación. En el caso de las Acetobacter, no se ve crecimiento en el primer día, pero si crecen en cantidades considerables en los demás días, aumentando en cada día. Las bacterias ácido lácticas no se observan en el primer día de siembra, sino hasta el día dos, en pequeña cantidad; que posteriormente van en aumento.

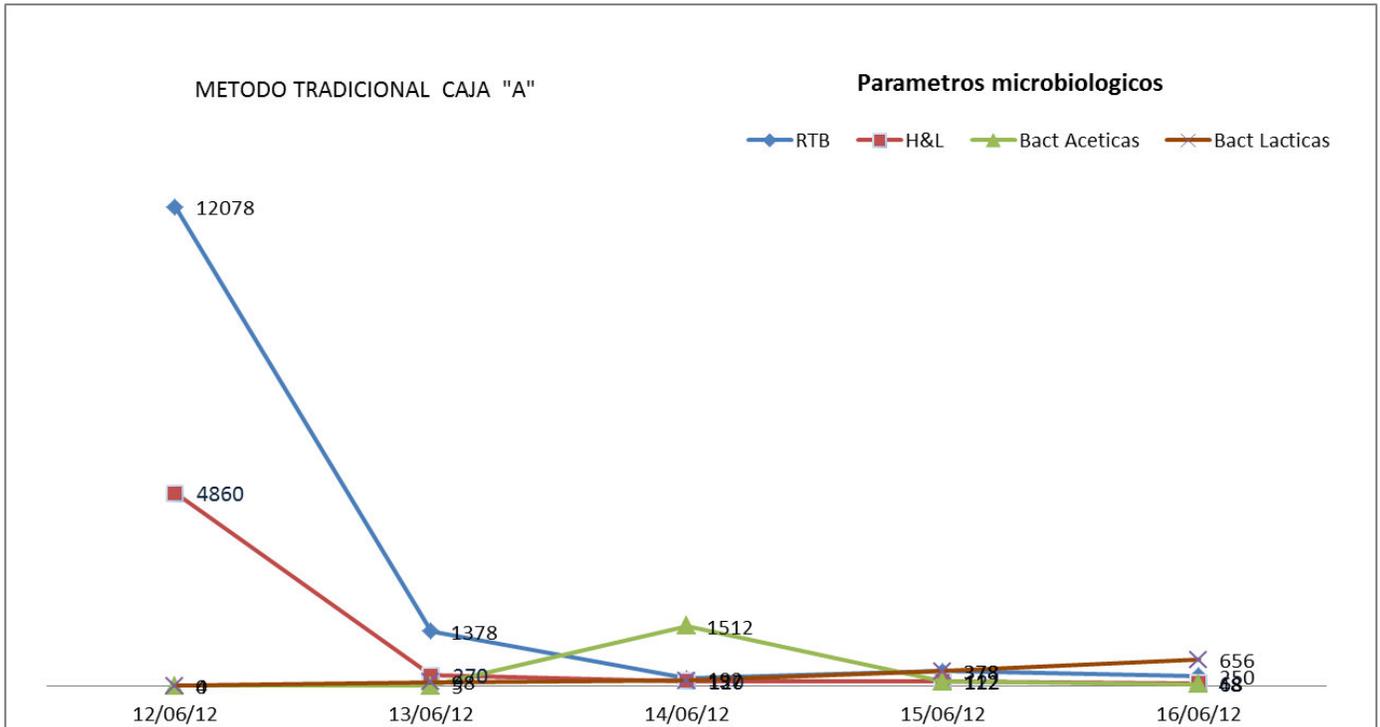
Tabla 17. Resultados en MNT (Método no Tradicional).

METODO NO TRADICIONAL															
Dia 1			Dia 2			Dia 3			Dia 4			Dia 5			
12-jun			13-jun			14-jun			15-jun			16-jun			
CAJAS			CAJAS			CAJAS			CAJAS			CAJAS			
parametro	A	B	C	A	B	C	A	B	C	A	B	C	A	B	C
	UFC / 1mL														
RTB	2330	1324	2109	1200	980	976	690	760	765	567	453	498	139	309	265
H&L	13451	14567	11345	15643	15342	13457	16785	17654	15676	12898	15387	17895	17908	15786	20967
Bact Aceticas	0	0	0	78	98	102	239	456	765	897	765	894	1209	1154	1325
Bact Lacticas	0	0	0	2	5	1	11	17	37	63	59	97	321	213	179

En la tabla anterior se puede observar que los resultados obtenidos y registrados del duplicado de siembra (se realizó siembra por duplicado) tienen relación con los de la tabla anterior, los datos están cercanos, por lo que se puede decir que el análisis realizado estuvo bien. El comportamiento y crecimiento de los microorganismos.

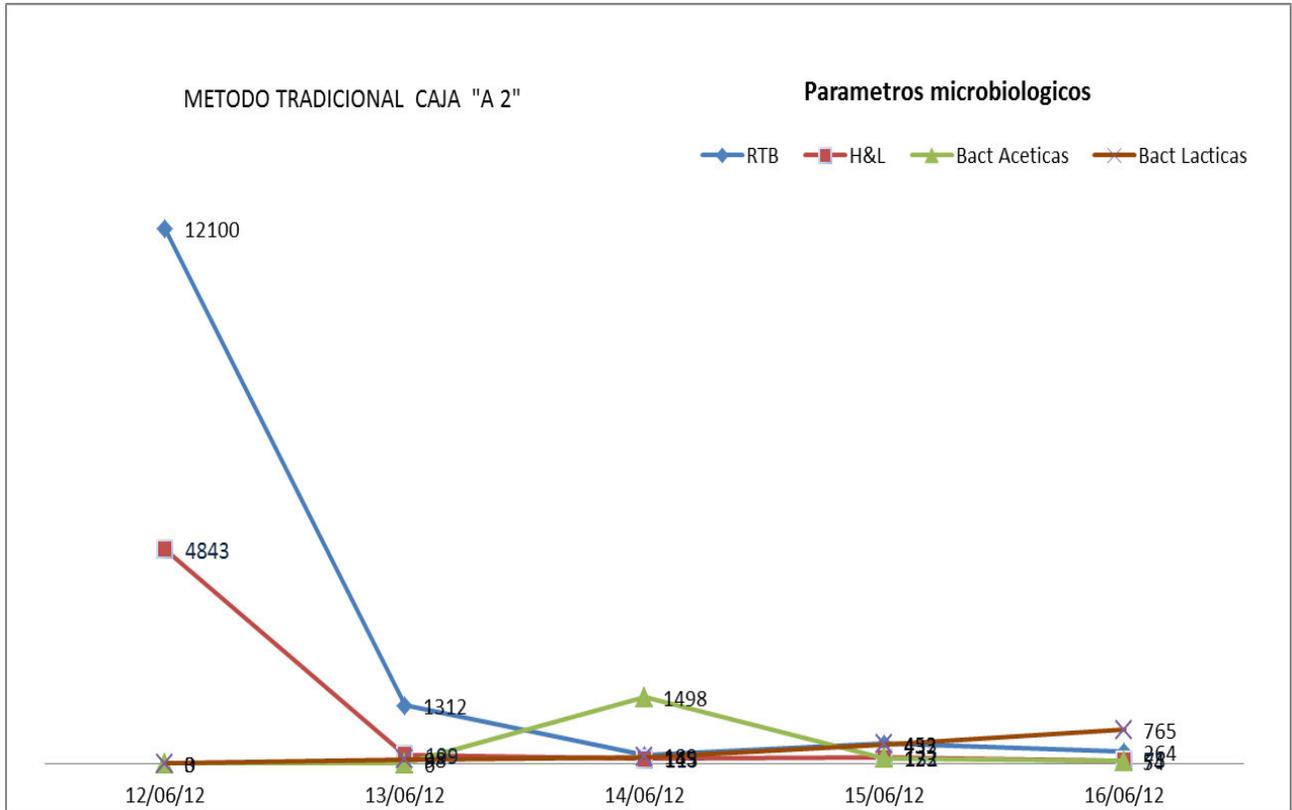
GRÁFICOS DE MÉTODO TRADICIONAL

Tabla No 18 Grafico 1. Parámetros microbiológicos de método tradicional caja de madera A



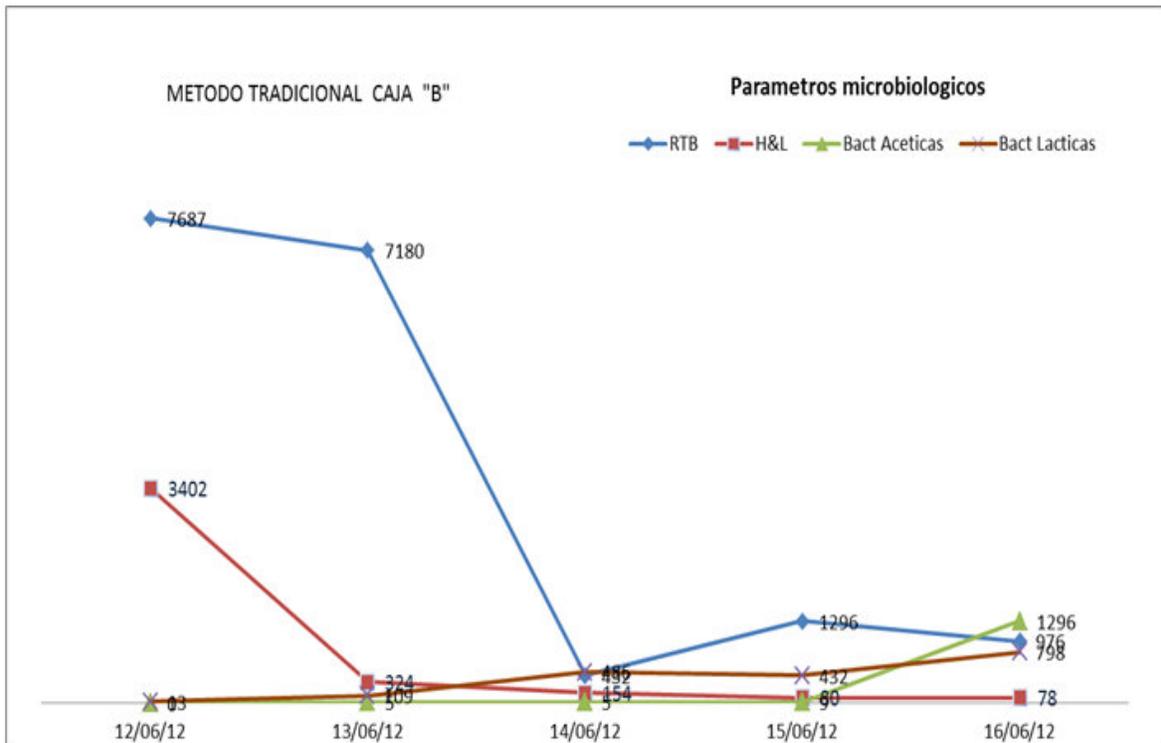
En el gráfico anterior se pudo observar cómo han crecido las bacterias mesolíticas, siembras realizadas después de 24 horas, que después va disminuyendo, posiblemente por el alcohol producido por las pocas levaduras; en el caso de las Levaduras, se observa crecimiento moderado de levaduras en las primeras 24 horas, después de 48 horas se observa disminución. En el caso de las bacterias acéticas se percibe olor a ácido acético y se observa crecimiento después de 48 horas de fermentación, en el cuarto día de siembra se observa una disminución, las cuales irían disminuyendo en los siguientes días. En el caso de las bacterias Lácticas, el comportamiento es ascendente, no se observa disminución una vez comienzan a crecer, aún que en poca cantidad.

Tabla No 19. Grafico 2. Parámetros microbiológicos de método tradicional caja de madera A 2



En este gráfico corresponde a las siembras por duplicado realizadas a la caja de madera “A”, identificada como “A2” del método tradicional, la información nos indica casos muy similares a las siembras descritas en el gráfico anterior, ya que corresponden a la misma caja. El RTB, mantiene la misma trayectoria de crecimiento, las levaduras con el mismo comportamiento y las bacterias acéticas y lácticas por consiguiente.

Tabla No 20. Grafico 3. Parámetros microbiológicos de método tradicional caja de madera B



En este grafico se puede observar como baja la cantidad de RTB, pero se mantienen predominadas en todo el proceso de fermentación. En el cuarto día se observa un leve aumento lo que podría indicar una contaminación cruzada, ya que este tipo de bacterias nos indican en grado de suciedad; La línea roja corresponde a las levaduras, las cuales disminuyen en las primeras 48 horas de fermentación y este comportamiento de disminución se mantiene en el proceso de fermentación. La línea verde corresponde a las bacterias acéticas, las cuales se observa crecimiento después de 48 horas y las líneas ocre corresponden a las bacterias lácticas, que inicia su aparición muy lentamente en el segundo día, pero que en el transcurso de la fermentación van aumentando aun que en

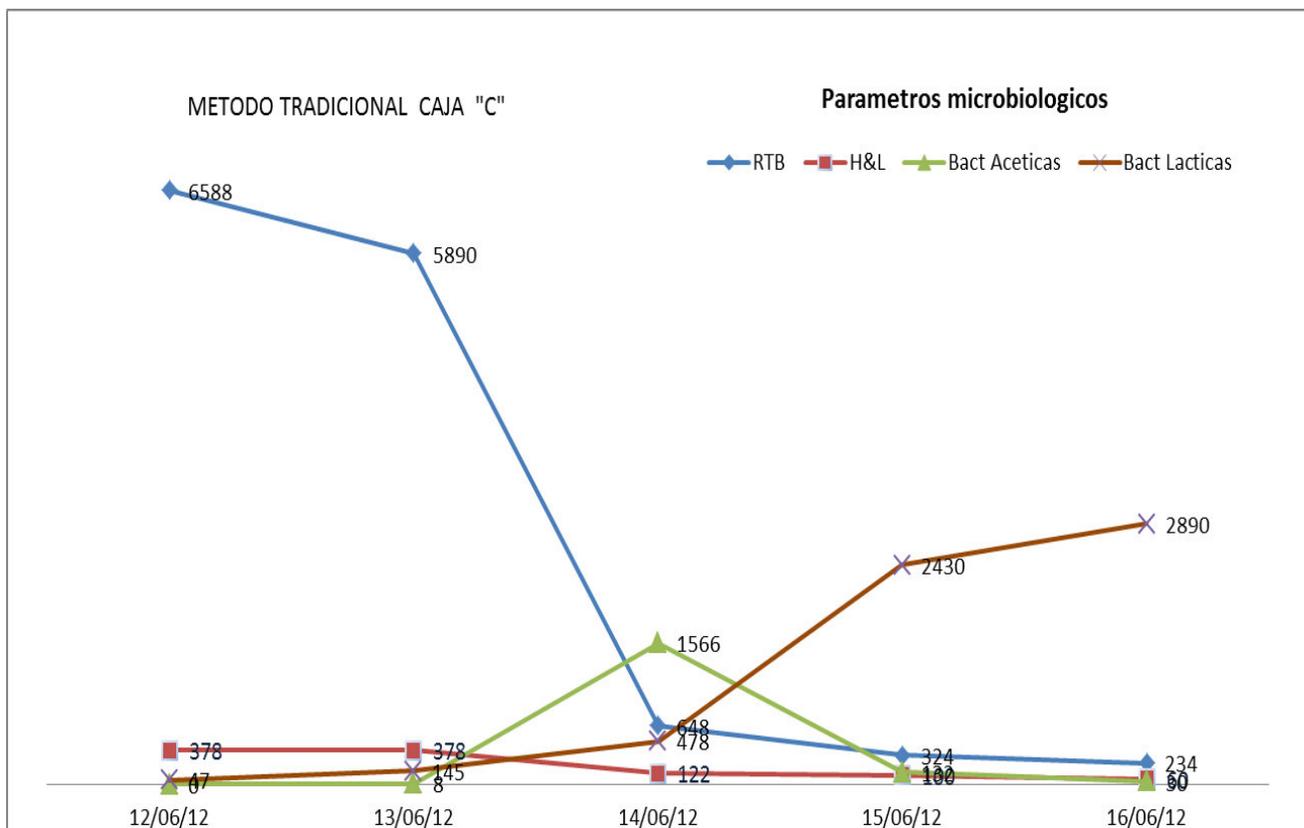
pequeñas cantidades. En el grafico se muestra un elevado crecimiento en RTB, que después de 72 horas va disminuyendo.

Tabla No 21. Grafico 4. Parámetros microbiológicos de método tradicional caja de madera B 2

El grafico anterior corresponde a las siembras realizadas por duplicado a la caja de madera "B", identificada como "B2" del método tradicional, la información nos indica casos muy similares a las siembras descritas en el grafico anterior, ya que corresponden a la misma caja. El RTB, mantiene la misma trayectoria de crecimiento, las levaduras con el mismo comportamiento; pero en el caso de las bacterias acéticas se ve una pecunia elevación de la curva en el tercer día; lácticas mantienen aumento lento y constante.

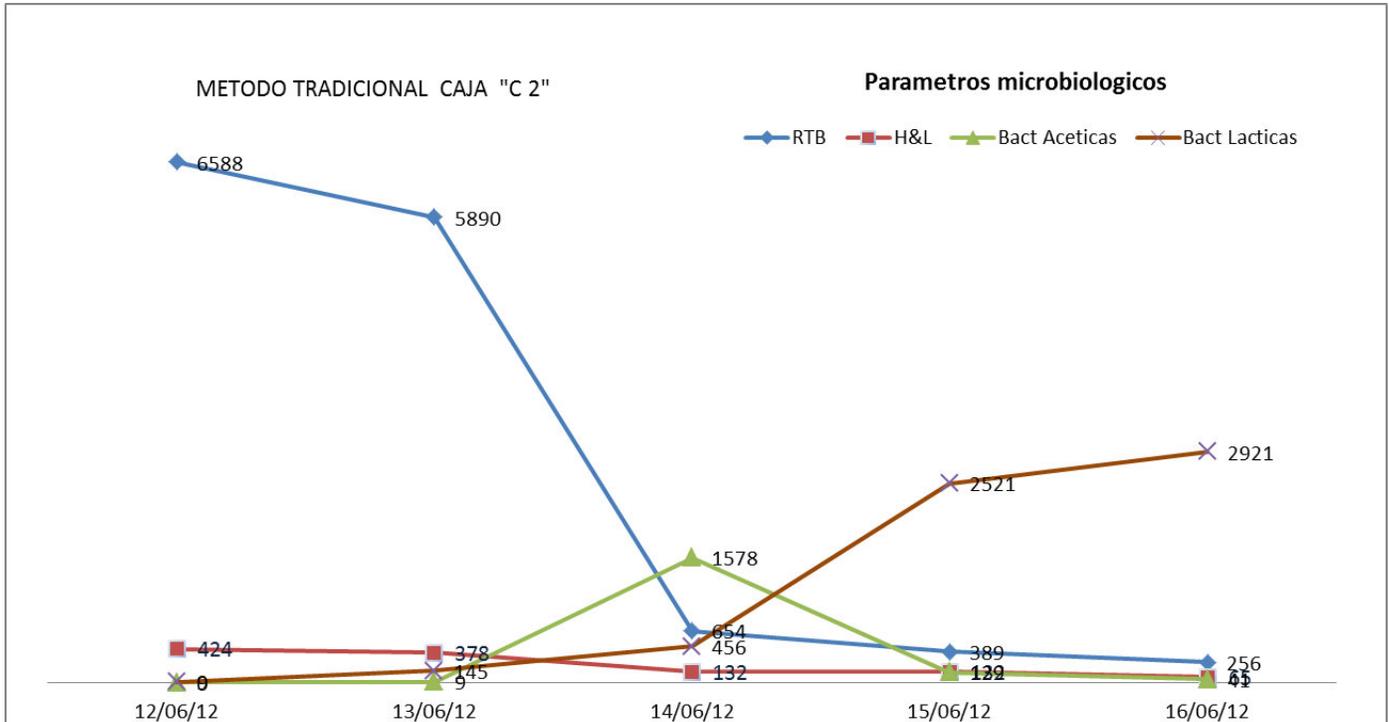
Tabla No 22

. Grafico 5. Parámetros microbiológicos de método tradicional caja de madera "C"



Este grafico corresponde a la caja "C", del método tradicional; en este se muestra un crecimiento elevado de Bacterias aerobias misofilicas (RTB) en el primer día de siembra. Y al igual que en los otros casos estas disminuyen en el segundo día de siembra, mostrando una caída considerable en el tercer día de siembra. Para las levaduras se puede apreciar que su crecimiento es mas poco en relación a las otras cajas; a las 48 horas se puede observar crecimiento de bacterias acéticas que aumenta considerablemente en el tercer día de siembra (correspondiente a 72 horas de fermentación). En el caso de las bacterias lácticas se puede ver que en el tercer día aumentan considerablemente, manteniendo su crecimiento en el quinto día de siembra.

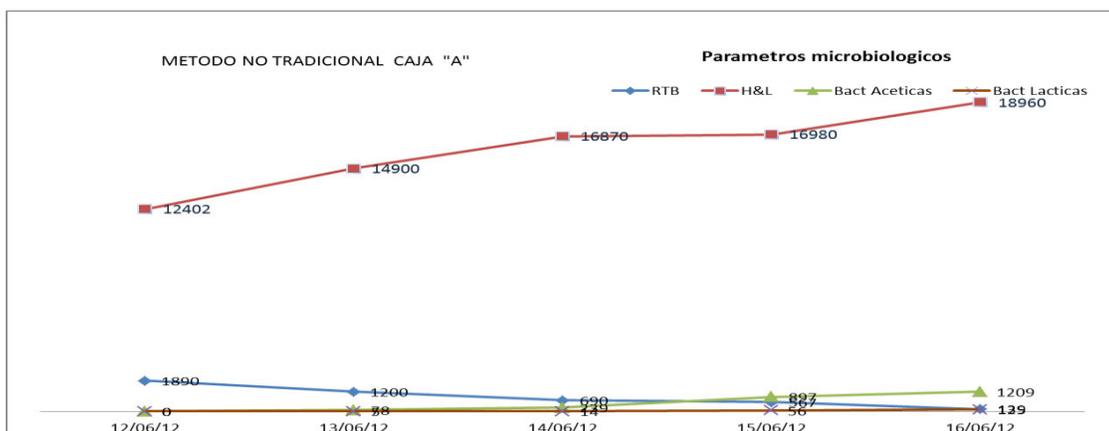
Tabla No 23. Grafico 6. Parámetros microbiológicos de método tradicional caja de madera "C2"



El grafico anterior corresponde a las siembras realizadas por duplicado a la caja de madera "C", identificada como "C2" del método tradicional, en este se puede ver que el crecimiento microbiológico es muy parecido al grafico C, esto responde a que se trata de muestra de la misma caja. El RTB, mantiene la misma trayectoria de crecimiento, las levaduras con el mismo comportamiento; pero en el caso de las bacterias acéticas se ve una pequeña elevación de la curva en el tercer día; las bacterias lácticas se elevan en el cuarto día.

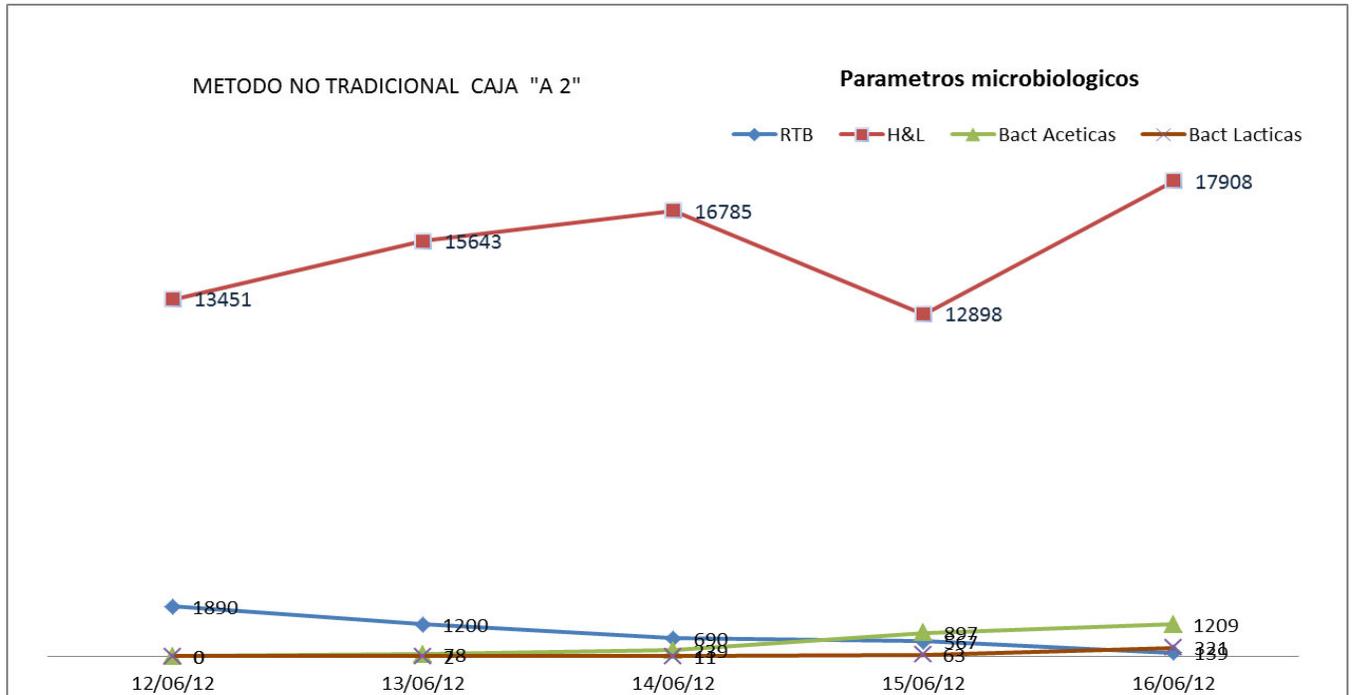
GRAFICOS DE METODO NO TRADICIONAL

Tabla No 24. Grafico 7. Parámetros microbiológicos de método no tradicional recipiente "A"



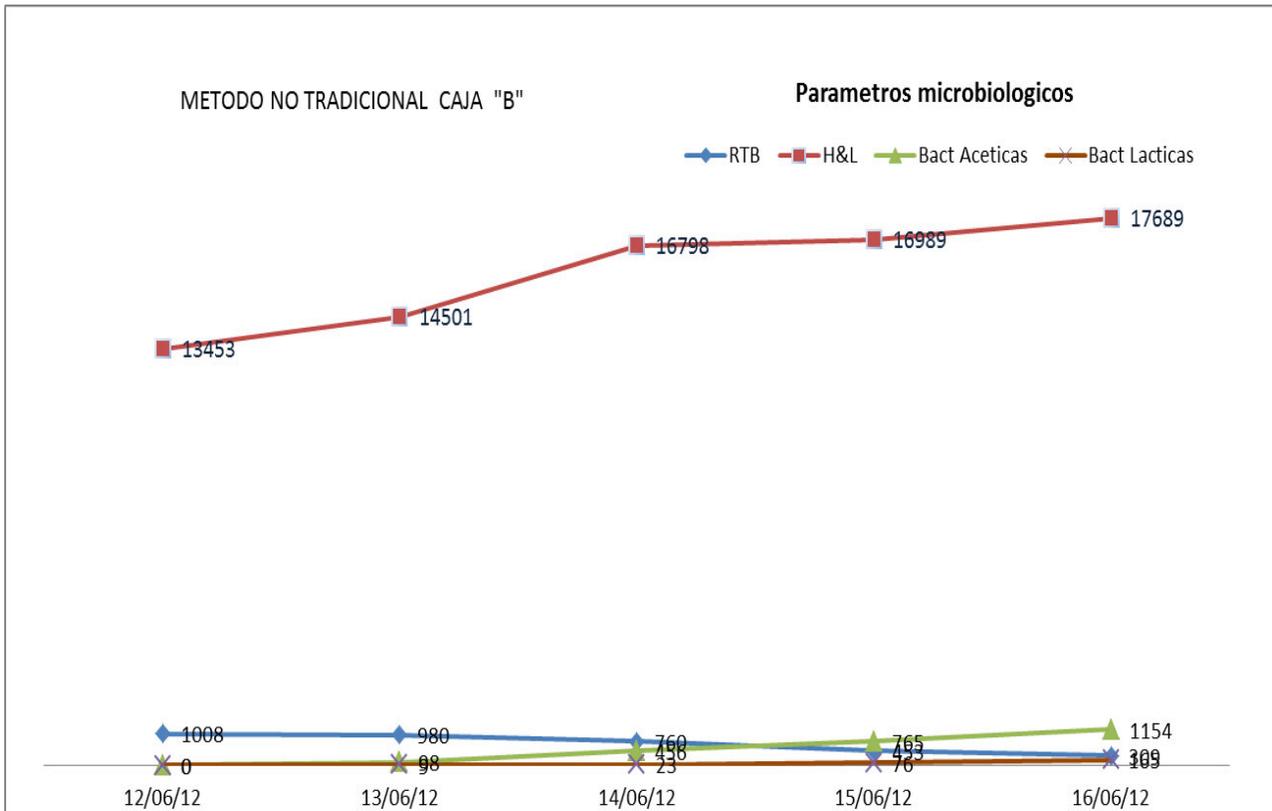
El grafico anterior corresponde a la caja A del método no tradicional, las líneas rojas nos indican el crecimiento de levaduras, las líneas celestes al RTB, la línea verde a bacterias acéticas y la ocre a las bacterias lácticas; en comparación al método tradicional se puede ver cambios muy interesantes, ya que los Recuentos de bacterias mesofilicas es muy bajo y las levaduras es todo lo contrario. Es importante mencionar que en este caso se han agregado levaduras para acelerar la fermentación y vistas en el grafico se puede apreciar cómo van aumentando en todo el proceso; esta disminución de RTB, se puede deber a la alta concentración de alcohol, creado por las levaduras, vistas al microscopio es poco el espacio que no ocupado por las levaduras (vista X campo del objetivo del microscopio), en el caso de las bacterias acéticas es muy poco el crecimiento en comparación de las levaduras, el olor a alcohol es más fuerte que el del ácido acético formado por las Acetobacterias, esto es notorio por la escasa cantidad de las mismas; en el caso de las bacterias lácticas estas son mas pocas aun. Por lo que la fermentación es más alcohólica.

Tabla No 25. Grafico 8. Parámetros microbiológicos de método no tradicional recipiente "A2"



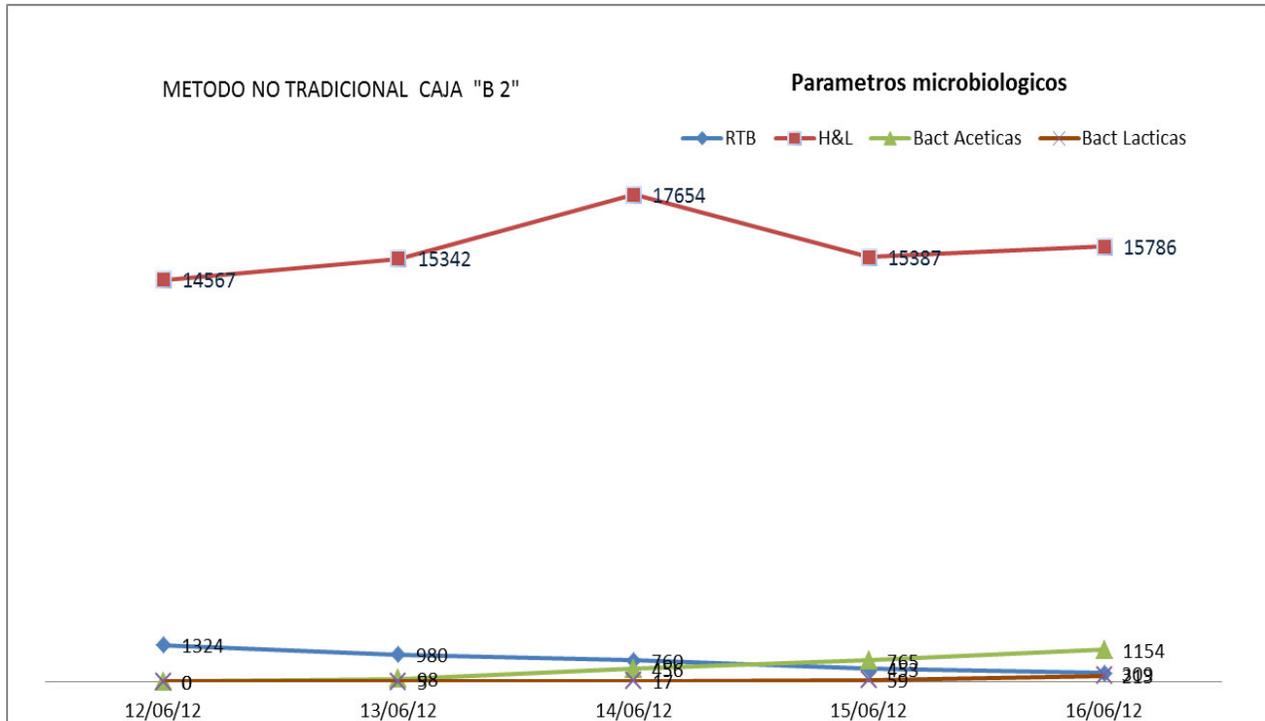
Este grafico corresponde a las siembras por duplicado del recipiente "A", identificado como "A2". A diferencia del grafico anterior el único cambio es que las levaduras sufren una mínima caída de crecimiento en el cuarto día, según el cuadro físico químico el °Brix estaba a 13.5 muy parecido a los otros días por lo que se descarta la falta de azúcar en el proceso, aun que al agregarle mas la producción mejoro. Los otros parámetros se mantienen muy parecidos al grafico anterior.

Tabla No 26. Grafico 9. Parámetros microbiológicos de método no tradicional recipiente "B"



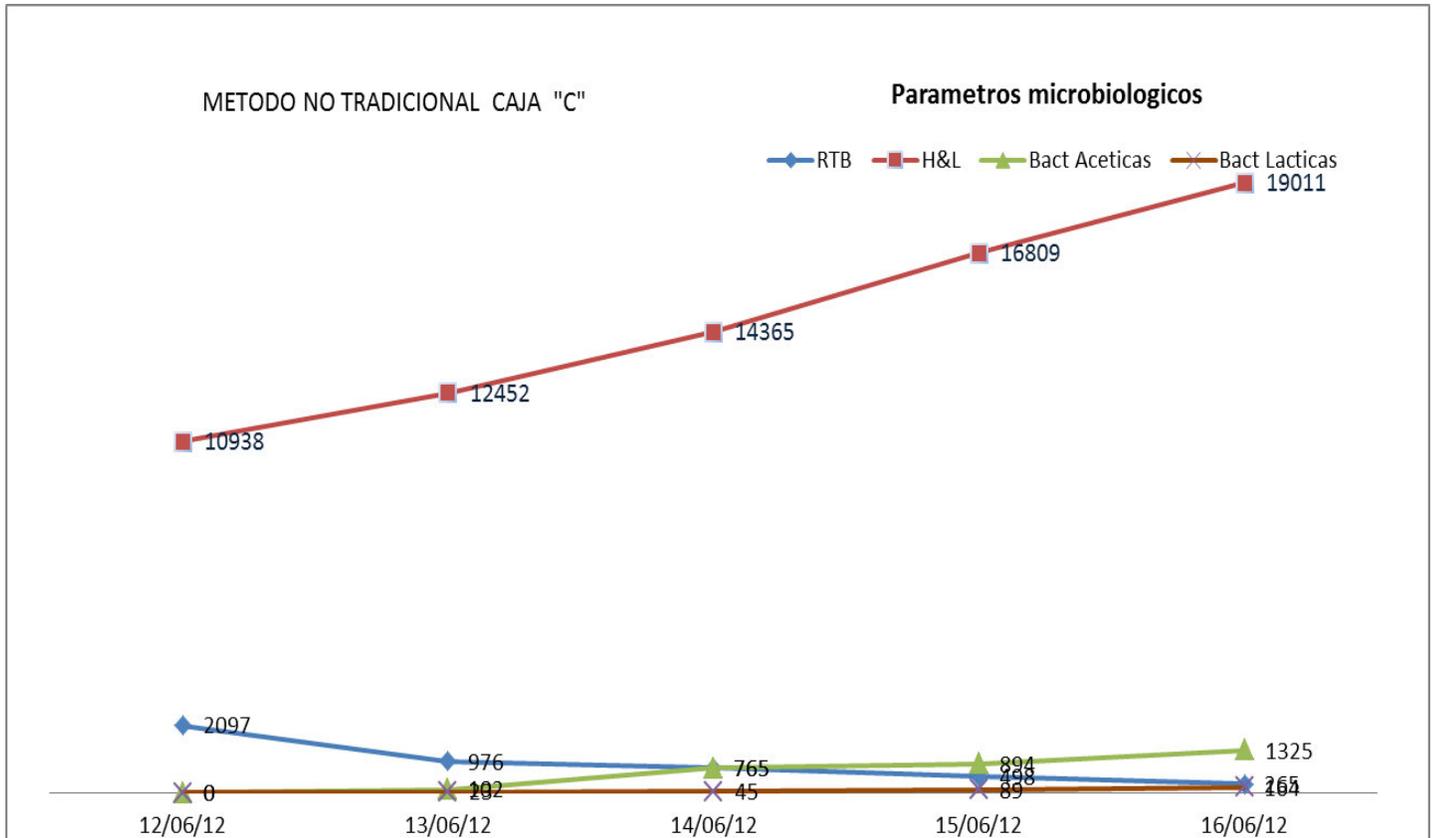
Este grafico corresponde al recipiente "B", del método no tradicional, las líneas rojas nos indican el crecimiento de levaduras, las líneas celestes al RTB, la línea verde a bacterias acéticas y la ocre a las bacterias lácticas. Según la información brindada en este grafico las levaduras predominan de una forma muy elevada y su crecimiento continúa aun después de 5 días de fermentación, ya que existe material necesario para su reproducción; respecto al RTB, se ve muy buena presencia, pero que después e 48 horas va en disminución, de la misma manera se observa crecimiento de bacterias acéticas pero su crecimiento es lento y escaso, el mismo fin mantienen las lácticas.

Tabla No 27. Grafico 10. Parámetros microbiológicos de método no tradicional recipiente "B2"



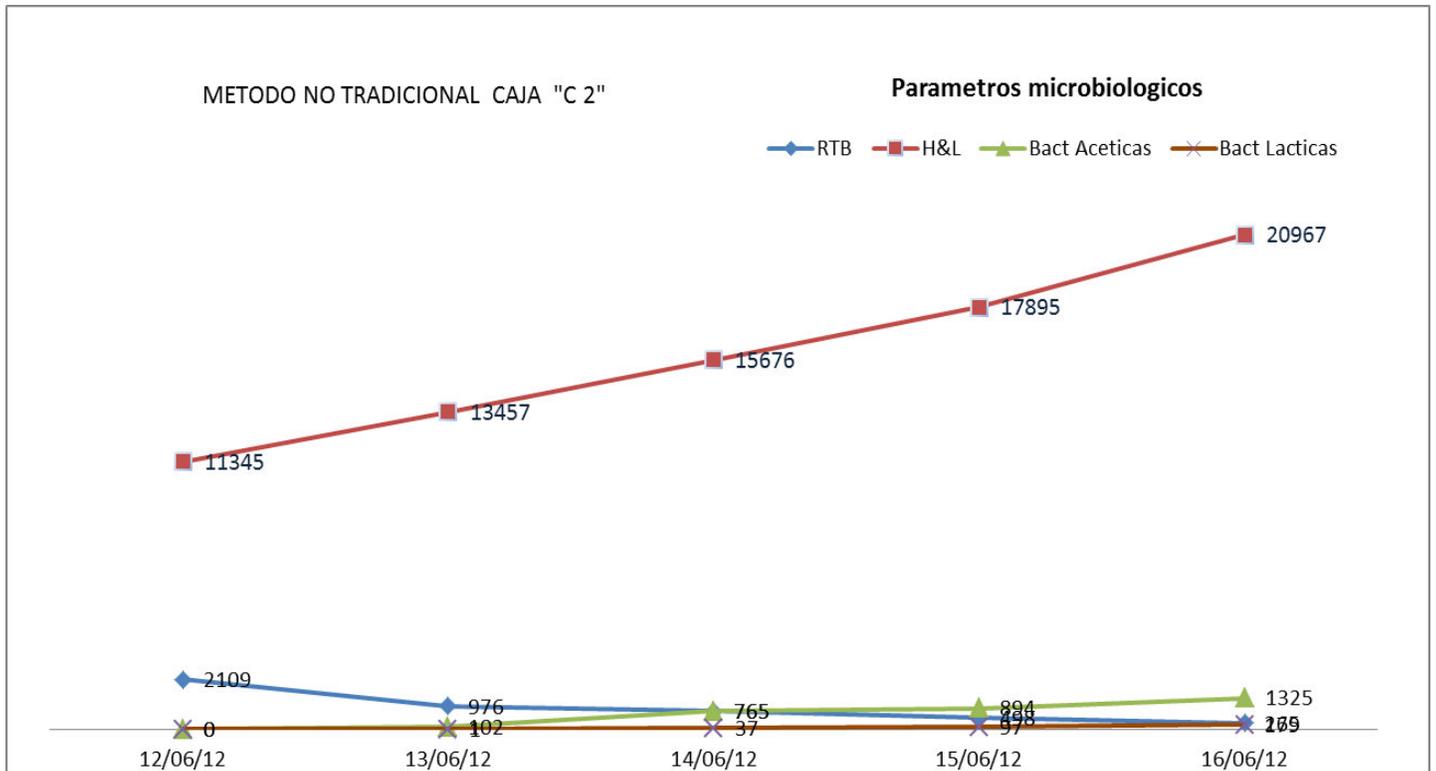
En el grafico anterior corresponde a la siembra por duplicado del recipiente "B", en este caso identificado como "B2"; las líneas rojas nos indican el crecimiento de levaduras, las líneas celestes al RTB, la línea verde a bacterias acéticas y la ocre a las bacterias lácticas. A diferencia de la información brindada por grafico anterior, las levaduras disminuyen levemente en el cuarto día pero estas aumentan en el quinto día; los recuentos de bacterias mesofilicas, acetobacter y lácticas están muy bajo en relación a la gran cantidad de levaduras.

Tabla No 28. Grafico 11. Parámetro microbiológico de método no tradicional recipiente "C"



Ese grafico corresponde al recipiente "C" y las líneas rojas nos indican el crecimiento de levaduras, las líneas celestes al RTB, la línea verde a bacterias acéticas y la ocre a las bacterias lácticas. La línea roja indica un crecimiento gradual y elevado de levaduras las cuales fueron en aumento en todo el proceso de fermentación; En el caso de RTB buena cantidad al inicio las cuáles disminuyen considerablemente después de 48 horas; si existe presencia de acetobacter y bacterias lácticas pero después e 48 horas y en cantidades muy pequeñas comparadas a las levaduras. Por lo que la fermentación es más alcohólica.

Tabla No 29. Grafico 12. Parámetro microbiológico de método no tradicional recipiente "C2"



En el grafico anterior corresponde a la siembra por duplicado de las muestras del recipiente "C", identificado como "C2"; las líneas rojas nos indican el crecimiento de levaduras, las líneas celestes al RTB, la línea verde a bacterias acéticas y la ocre a las bacterias lácticas. En éste se puede contemplar que el crecimiento de las levaduras va en aumento, en cada día de siembra, en cuanto al RTB al inicio del proceso de fermentación existía menos cantidad, las cuales fueron disminuyendo en el proceso de fermentación de las levaduras; de la misma manera las otras bacterias (acéticas y lácticas) no se les permitió crecer mucho, predominando así las Levaduras.

Capítulo V

5.1 Conclusiones

Después de haber realizado un análisis de los resultados se puede concluir que:

A. En el método tradicional:

1. Con este método no se logra obtener fermentación al 100%, aun manteniéndolo hasta 6 días, y en algunas ocasiones se puede obtener sabores ácidos, y esto se puede deber a la poca presencia de levaduras, permitiendo el crecimiento de bacterias ácidas, las cuales le confieren fermentación ácida.
2. Las hojas de huerta que se colocan para tapar las cajas y que tradicionalmente se cree ayudan en la inoculación de levaduras, no cumplen con esa función; en esta investigación se realizó análisis microbiológico a la huerta, observando en la siembra formación de hongos y no así de levaduras, por lo que en lugar de ayudar podría perjudicar a la fermentación, ver **Anexo 1. Fotografías de la ejecución del proyecto en relación a los análisis y prácticas realizadas, sección: Análisis microbiológico Método tradicional**
3. El azúcar presente en las semillas no es suficiente para el alimento de las pocas levaduras que se desarrollan en las cajas, por lo que la vida de estas es muy corta y al no haber reproducción de levaduras la cantidad de fermentación es corta y muy poca, afectando directamente en la calidad de las semillas.

4. El olor de las semillas fermentadas tradicionalmente no es tan bueno como el método no tradicional, esto se debe a la presencia de las bacterias acéticas y lácticas.
5. Es más fácil que las semillas se pudran en este método esto se debe a que el método permite que los hongos ataquen a la semillas los mosquitos logran depositar sus huevecillos y exista la presencia de microorganismos que podrían ser perjudiciales a la salud.
6. Al no haber mezcla adecuada de las semillas se podría perder las semillas, esto por la formación de Recuento Total de Bacterias.
7. En el método tradicional se permite el crecimiento alto de bacterias indicadoras de suciedad, esto por la poca formación de alcohol.
8. Al haber pocas levaduras no se produce alcohol, favoreciendo la descomposición de las semillas por el excesivo crecimiento de bacterias que no favorecen al cacao.

B. Método no tradicional.

9. Con el método no tradicional se facilita la fermentación, ya que se observa en las semillas el cambio de coloración. Además en cuestión de 5 días ya se observa una fermentación excelente evidenciado por el color café en las semillas)
10. Con el método tradicional se impide el crecimiento de bacterias heterotróficas, las cuales indican suciedad, ayudando a mantener un proceso de fermentación más limpia.
11. La producción de alcohol, por parte de las levaduras ayuda a mantener un ambiente más limpio impidiendo el crecimiento de otras bacterias.
12. Al haber presencia de más levaduras la temperatura en la fermentación es mayor que en el método tradicional.
13. El olor de las semillas fermentadas con este método es más agradable comparada con el método tradicional, esto se puede deber al controlado crecimiento de bacterias acéticas y lácticas las cuales producen ácidos que penetran en las semillas brindando sabores y olores ácidos, que si son necesarios pero controlados.
14. A medida que los procesos analíticos mejoran, como es el caso de esta investigación; aumentan posibilidad de mejorar la calidad y controlar los gustos de cualquier consumidor de chocolate.

5.2 Recomendaciones

- ✓ Para futuras investigaciones se recomienda hacer siempre diluciones en el proceso de siembra microbiológica, para facilitar la cualificación de colonias.

- ✓ Poseer los materiales necesarios para realizar investigaciones de este tipo medios de cultivos adecuados; así como los equipos de medición fisicoquímicos. Con el fin de obtener mejores resultados en la investigación.

- ✓ Para el secado del grano solar, muchas veces se puede tener la dificultad que no se tenga sol, ya sea por temporales o tormentas, en este caso es necesario poseer sustitutos de radiación solar que no interrumpan el secado del grano, caso contrario se corre el riesgo de producir cacao con olores desagradables.

- ✓ Para mejorar y disminuir costos en la fermentación no tradicional se debe realizar estudios de evaluación de sustitutos del azúcar en el proceso de fermentación.

Capítulo VI

6.1 Bibliografía

Libros

1. ASSOCIATION OF THE ANALYTICAL CHEMISTS. AOAC. 1997. Official methods of analysis. 16th Edition. Gaithersburg, Maryland, USA. Cap. 31. pp 1-17.
2. Castañeda V, Bonilla G, Pérez J., (2012) “Estudio de Aplicación de Descriptores Agromorfológicos para la Identificación y Registro de Cultivares Salvadoreños de *Theobroma cacao* “ 1^a Edición, Librería Delgado, Printshop, Universidad Dr. José Matías Delgado.
3. León A., Libardo (2007) “Determinación de las mejores condiciones en la técnica de osmodeshidratación de zanahoria variedad *Royal chantenay* y remolacha variedad *Early Gonder*, cultivadas en la granja Tesorito de la Universidad de Caldas” Vector, Volumen 2, págs. 85 – 102
4. SAMAH, O. A., M. FARED PUTIH and J. SELAMAT. 1992. Biochemical changes during fermentation of cocoa beans inoculated with *Saccharomyces cerevisiae* (Wild strain). J. Food Sci. Technol. Pag:341-343.
5. Pérez Gómez, Juan Manuel y Col. “*Manual de Aplicación de Descriptores Agromorfológicos para la Identificación y Registro de Cultivares Salvadoreños de Theobroma cacao*”. Universidad Dr. José Matías Delgado. Facultad de Agricultura e Investigación Agrícola. La Libertad, El Salvador .2009

6. Federación Nacional de Cacaoteros. "*Caracterización fisicoquímica y beneficio del grano de cacao (Theobroma cacao L.) en Colombia*". FEDECACAO. Bogotá, Colombia. Abril, 2005

Internet

1. Cultivo de cacao.
<http://www.fedecacao.com.co/cw/index.php?secinfo=25&criterio=0> fecha de consulta: 9 de abril de 2012 [en línea]
2. cacao [<http://en.wikipedia.org/wiki/Cacao>] fecha de consulta: 6 de mayo de 2012 [en línea]
3. El cultivo de cacao, [<http://www.infoagro.com/herbaceos/industriales/cacao.htm>], fecha de consulta: 3 de mayo de 2012 [en línea]

ANEXOS

Anexo 1. Fotografías de la ejecución del proyecto en relación a los análisis y practicas realizadas.

Recolección de las muestras de cacao y análisis fisicoquímico

Descripción de actividades en el procesado de instigación.	Fotografías
Se realizo extracción de las mazorcas de cacao Forastero, desde la Hacienda la carrera. Para posteriormente pasarlas.	
Se seleccionaron las mazorcas las cuales cumplan con las características de cacao Forastero.	

Se realizo corte de las mazorcas para extraer las semillas.



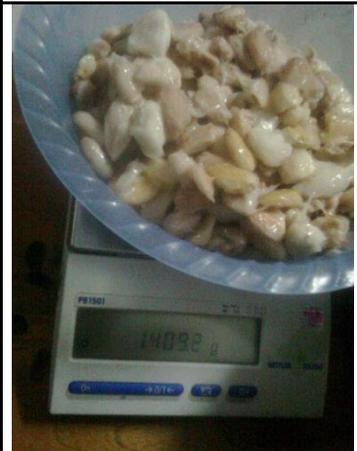
El corte se realizo con el cuidado de no cortar las semillas, pero que fuese suficiente para poder abrirlas.

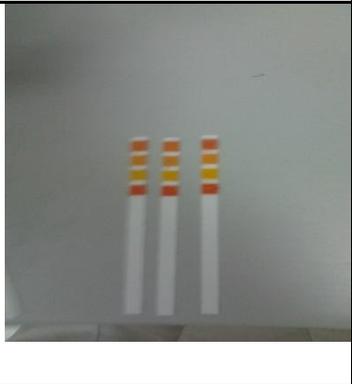


Se extrajo las semillas y se colocaron en recipientes limpios.



Posteriormente se realizo el pesado de las semillas.



<p>Se seleccionaron al azar 10 semillas para medir sus diámetros</p>	
<p>Se ajusto el pie de rey (calibrador) para medir las semillas.</p>	
<p>Se realizo medición de ancho y largo de las 10 semillas, anotando cada uno de los datos.</p>	
<p>Se realizo medición de pH, con tiras y con ph-chimetro.</p>	
<p>Cada día se realizo medición de temperatura a cada muestra, tanto el método tradicional como el no tradicional y cada día.</p>	

<p>A cada muestra se realizo medición del porcentaje de alcohol, tanto el método tradicional como el no tradicional y cada día.</p>	
<p>Cada día se realizo medición del porcentaje de, ácido acético, tanto el método tradicional como el no tradicional y cada día.</p>	
<p>Se realizo medición de los grados Brix a cada muestra, tanto el método tradicional como el no tradicional y cada día.</p>	

Análisis microbiológico

Método no tradicional

<p>Preparación de medios de cultivo: Se peso cada uno de los medios de cultivos necesarios para las siembras de las muestras.</p>	
---	---

Se realizo preparación de los medios de cultivo para cada uno de los análisis a determinar. Entre los medios preparados se encuentran: Estandar-1, RAE, MRS, PDA y/o Sabourau.



Se realizo las siembras de cada una de las muestras correspondientemente a cada determinación de bacterias: acéticas, lácticas, hongos y levaduras y RTB (Recuento Total de Bacterias)



La incubación para RAE y MRS se utilizo sobres de anaerobiosis, con el fin de evitar la presencia de oxigeno, esto se realizo antes de incubarlas.



Para la determinación de Bacterias Acéticas, lácticas y RTB, se realizaron lecturas cada 48 horas.



Para la determinación de Hongos y levaduras, las lecturas se realizaron a los 7 días incubación.



Se realizaron lecturas microbiológicas cada día, después de las primeras 48 horas, para esta actividad se utilizó un contador de colonias.



Antes de realizar el análisis fisicoquímico y adicionar azúcar para ajustar el Brix, se extraía una pequeña muestra y se observaba al microscopio la cantidad de células que se mantenían en las semillas



Visualización de las levaduras presentes en los recipientes plásticos, estas son las que se agregaron en cada uno de las muestras, causantes de la fermentación en el cacao. Disminuyendo el tiempo de fermentación. En la imagen se observa el crecimiento de levaduras un día después de haber ajustado el Brix.

En el día de lectura se realizo tinciones de Gram, para determinar el tipo de microorganismos, si correspondían a Gram negativos o Gram positivos.



Verificación de etapas de fermentación de las semillas. Método visual

Método no tradicional.

<p>Se seleccionaron 10 semillas al azar para la respectiva evaluación visual de fermentación, denotándola por el cambio de color en las semillas.</p>	
<p>Se realizó este muestreo de cada uno de los recipientes y se ordenaron para posteriormente realizar corte de semillas</p>	
<p>Se ubicaron separadamente indicando como A, B y C respectivamente, esto para identificar de mejor forma.</p>	
<p>Primer día de fermentación de las semillas, se cortaban por mitad observando, el porcentaje de fermentación.</p>	

<p>Se realizo evaluación visual en cada uno de los recipientes de plástico, verificando en las semillas el cambio de color en cada semilla.</p>	
<p>Esta actividad se realizo hasta obtener el 100% de fermentación observando un cambio de color completo en las semillas, de color violeta a color café oscuro.</p>	
<p>Se realizo en cada uno de los recipientes, hasta observar cambio de color violeta a café oscuro.</p>	
<p>Se realizo visualización en el quinto día ; este es el color de las semillas en el que se ha obtenido el 100% de la fermentación del cacao del tipo Forastero</p>	

Semillas de cacao secadas al sol



Análisis microbiológico Método tradicional

En la fotografía se muestran hongos, extraídos en hisopado de una hoja de huerta, y estriada en medio de cultivo M-Green, para hongos y levaduras. Lo que indica que no crecieron levaduras como es la creencia, en microscopia directa se observaban solo hongos y no así levaduras, ya en la placa cultivada se observa el resultado esperado: crecimiento de hongos.



Día a día se realizó muestreo de cada caja, para realizar análisis microbiológico,



Para la dosificación de alcohol y Acido acético en la preparación de medio de cultivo RAE, para bacterias acéticas, se utilizó un filtro especial estéril descartable.



Las muestras se ordenaron para cada tipo de determinación para no confundir las siembras.



- Para eliminar el oxígeno en el proceso de incubación, se utilizó sobres de anaerobiosis, los cuales mantendrían un ambiente selectivo para bacterias anaerobias. (*Sobres para anaerobiosis marca Anaerocult*)

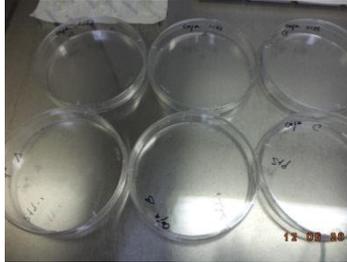
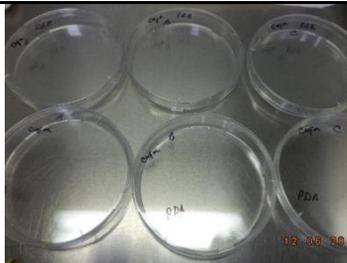


- Las diluciones se realizaron con unas puntas especiales llamadas combitips, las cuales eran descartables. (*Combitips de 5 mL marca Eppendorf*)



Además se utilizaron jeringas de 5 mL para las siembras de las muestras.



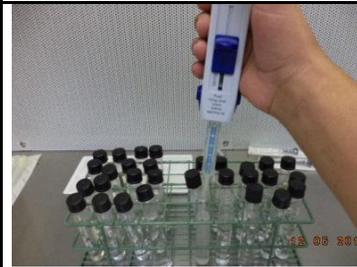
<p>Se marcaron las placas de 90X15, según correspondía la determinación a hacer.</p>	
<p>De la misma forma se marcaron las otras placas, primero se marcaron todas las placas para posteriormente solo realizar las siembras.</p>	
<p>Para abrir las bolsas estériles, se utilizo una tijera la cual se esterilizo con alcohol y después flameado con mechero.</p>	
<p>En la realización de las diluciones; el primer tubo se peso la muestra después se fue midiendo los micro litros, hasta obtener diluciones: diez a la menos cuatro.</p>	
<p>La pesada se realizo con mucho cuidado de no pasarse de peso y de no contaminar en la manipulación.</p>	

<p>Esta actividad se realizo con cada una de las muestras, hasta lograr diluir todas, para después solo realizar las siembras.</p>	
<p>En la fotografía se muestra el peso exacto de la muestra en el tubo, el cual correspondería a la menos 1.</p>	
<p>En cada uno de los procesos de dilución se realizo esterilización de las boquillas de los tubos para evitar contaminaciones cruzadas.</p>	
<p>Cada una de las bolsitas se esterilizó en la zona donde se realizaría el corte, con la tijera.</p>	
<p>Se ajusto el pipeteado para poder hacer otras diluciones.</p>	

Se prepararon las puntas antes de iniciar el proceso.



Después de haber pesado todas las muestras, se procedió a pipetear cada una para iniciar las diluciones.



Esta actividad se realizo cambiando cada punta por cada uno de los tubos, para no sesgar en la dilución evitando residuos de otras muestras, además de evitar contaminaciones.



Se cambiaron y descartaron las puntas, no haciendo reutilizaciones de materiales.



Para la esterilización de los medios de cultivo se utilizo autoclave digital. Los medios se esterilizaron a 121 °C por 15 minutos.



La programación se realizo de la siguiente manera:

- Se presionó el botón esterilizado de líquidos. Luego enter.
- Se ajusto el tiempo con flechas arriba abajo, hasta indicar 15 minutos. Luego se presionó enter.
- Por último se presionó la tecla inicio. El equipo realizaría el trabajo de esterilización automática.



Para la incubación de las placas para análisis de hongos y se utilizo incubadora ajustada la temperatura a 25°C \pm 2 grados



Para la incubación de bacterias acéticas, lácticas; se utilizo otra incubadora, la cual se ajusto a una temperatura de 42°C ± 2 grados



Para la incubación de las bacterias anaerobias, se utilizaron tinajas de para anaerobiosis. Manteniendo ambiente libre de aire.



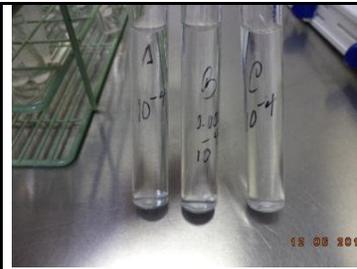
Para las siembras de otras determinaciones se utilizaron nuevas puntas marcadas con la dilución correspondiente.



Se colocaron las puntas en el micropipeteador, para iniciar las siembras de las muestras.



Los tubos utilizados contenían agua estéril, además se marcaron de acuerdo a la dilución realizada, se agitaron cuidadosamente.



Se realizaron las siembras marcando cada placa de acuerdo a las bacterias a determinar y la dilución correspondiente.



Las siembras se realizaron dentro de una cámara de flujo laminar, previamente esterilizada con lámpara ultravioleta.



Los medios se enfriaron hasta temperatura que no queme la piel del antebrazo, de esta manera se prueba que el medio sea adecuado para dosificar en las placas y que los microorganismos no se mueran por alta temperatura.



Se dosifico alcohol y ácido acético al medio RAE, después de haberlo esterilizado.



Para dosificar cada químico fue necesario cambiar el filtro descartable.



El medio de cultivo aun estaba caliente; pero con temperatura de unos 50 °C, adecuado para que los químicos e mezclen.



Se esterilizo una cuchara de acero inoxidable, para realizar la dosificación de medio de cultivo, esta actividad se utilizaron cucharas distintas.



Se esterilizo con mechero las boquillas de los frascos conteniendo los medios, para evitar contaminación cruzada.



Se dosifico el medio de cultivo en las placas, teniendo cuidado de no confundir las determinaciones.



La dosificación se realizo despacio para evitar salpicaduras de medio y muestra de cacao.



Después de haber dosificado el medio de cultivo en las placas se realizo homogenización, esto se hace con movimientos circulares formando un “8”; esto se realiza cuando ya se tiene un grupo de placas; pero que correspondan a esa misma determinación.



Se dejaron que el medio solidificara.

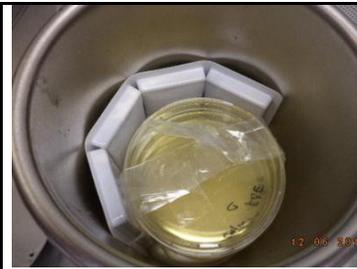
Las placas se colocaron en las tinas de anaerobiosis.



Se agregaron 35 ml de agua destilada en los cobres de anaerobiosis y se colocaron en las tinas para anaerobiosis.



Se colocaron cuidadosamente las placas y los sobres en los frascos, antes de cerrarlos.



Se coloca la tapa y se aseguran herméticamente, para evitar que el gas CO₂ se escape.



Se colocó la tina dentro de la incubadora, se cierra y se observará hasta que estas cumplan 48 horas.



Las placas para RTB, se colocan en otra incubadora.

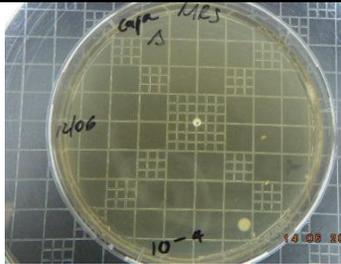
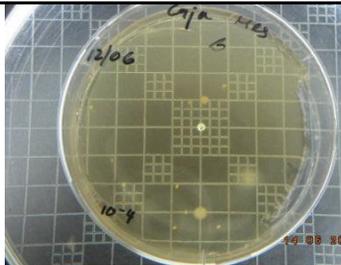
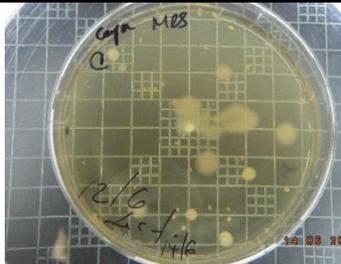


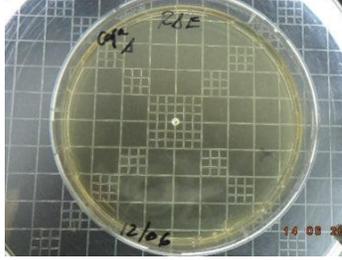
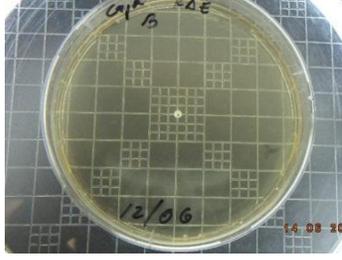
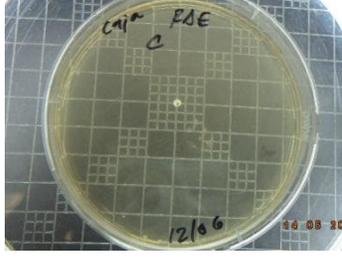
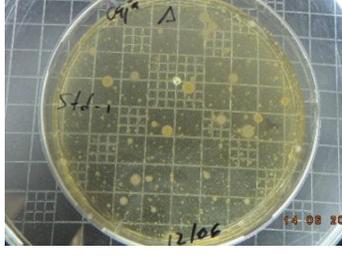
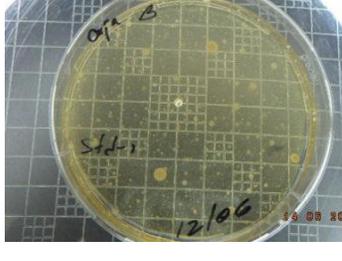
Se incubaron teniendo en cuenta que no necesitan tinas, ya que estas son bacterias aeróbicas. Y con una temperatura de incubación de $35^{\circ}\text{C} \pm 2$ grados.



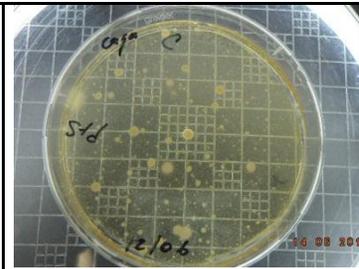
LECTURAS

PRIMER DIA

<p>Contador de colonias con pantalla táctil para registrar el conteo de las unidades formadoras de colonias.</p>	
<p>Lecturas de placas en con medio MRS, para determinación de bacterias Lácticas.</p>	
<p>Lecturas de placas en con medio MRS, para determinación de bacterias Lácticas.</p>	
<p>Lecturas de placas en con medio MRS, para determinación de bacterias Lácticas.</p>	

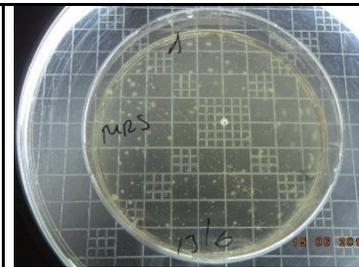
<p>Lecturas de placas en con medio RAE, para determinación de bacterias Acéticas.</p>	
<p>Lecturas de placas en con medio RAE, para determinación de bacterias Acéticas.</p>	
<p>Lecturas de placas en con medio RAE, para determinación de bacterias Acéticas.</p>	
<p>Lecturas de placas en con medio Stand-1, para determinación Recuento Total de Bacterias (RTB).</p>	
<p>Lecturas de placas en con medio Stand-1, para determinación Recuento Total de Bacterias (RTB).</p>	

Lecturas de placas en con medio Stand-1, para determinación Recuento Total de Bacterias (RTB).

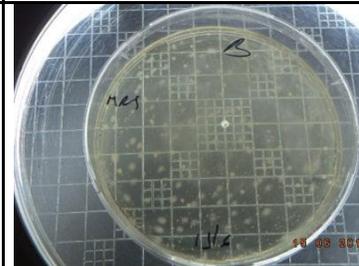


LECTURAS SEGUNDO DIA

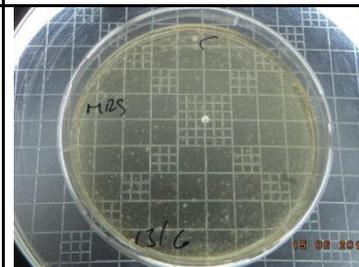
Lecturas de placas en con medio MRS, para determinación de bacterias Lácticas.

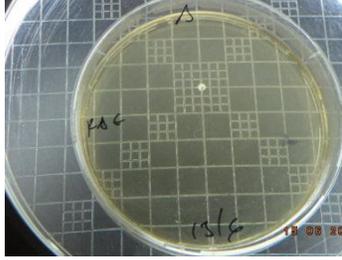
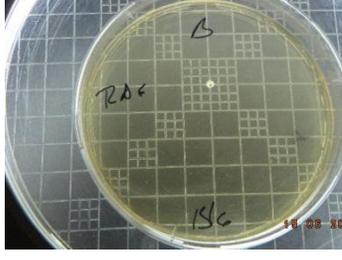
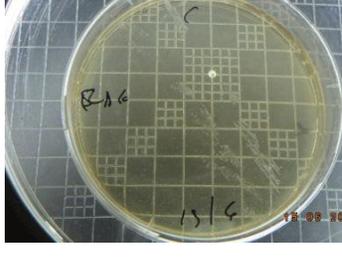
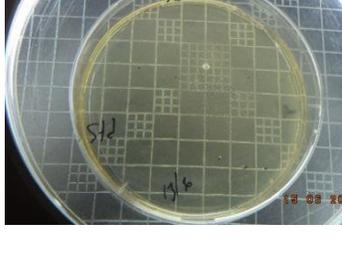


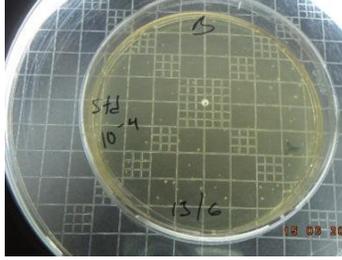
Lecturas de placas en con medio MRS, para determinación de bacterias Lácticas.



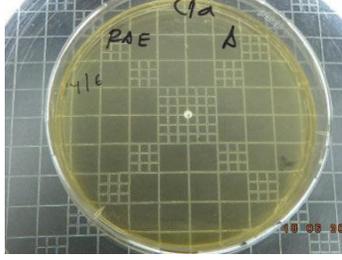
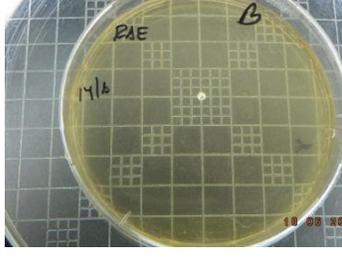
Lecturas de placas en con medio MRS, para determinación de bacterias Lácticas.

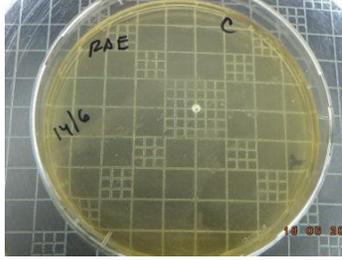
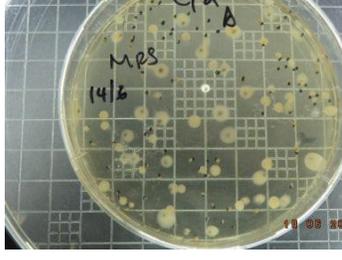
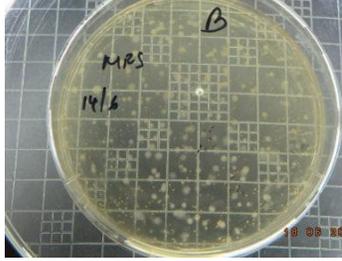
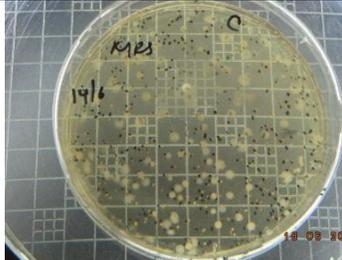
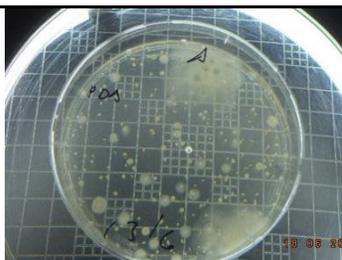


<p>Lecturas de placas en con medio RAE, para determinación de bacterias Acéticas.</p>	
<p>Lecturas de placas en con medio RAE, para determinación de bacterias Acéticas.</p>	
<p>Lecturas de placas en con medio RAE, para determinación de bacterias Acéticas.</p>	
<p>Lecturas de placas en con medio Stand-1, para determinación Recuento Total de Bacterias (RTB).</p>	
<p>Lecturas de placas en con medio Stand-1, para determinación Recuento Total de Bacterias (RTB).</p>	

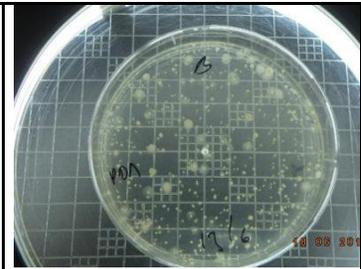
<p>Lecturas de placas en con medio Stand-1, para determinación Recuento Total de Bacterias (RTB).</p>	
<p>Lecturas de placas en con medio Stand-1, para determinación Recuento Total de Bacterias (RTB).</p>	

LECTURAS TERCER DIA

<p>Lecturas de placas en con medio RAE, para determinación de bacterias Acéticas.</p>	
<p>Lecturas de placas en con medio RAE, para determinación de bacterias Acéticas.</p>	

<p>Lecturas de placas en con medio RAE, para determinación de bacterias Acéticas.</p>	
<p>Lecturas de placas en con medio MRS, para determinación de bacterias Lácticas.</p>	
<p>Lecturas de placas en con medio MRS, para determinación de bacterias Lácticas.</p>	
<p>Lecturas de placas en con medio MRS, para determinación de bacterias Lácticas.</p>	
<p>Lecturas de placas en con medio PDA, para determinación de Hongos y Levaduras.</p>	

Lecturas de placas en con medio PDA, para determinación de Hongos y Levaduras.

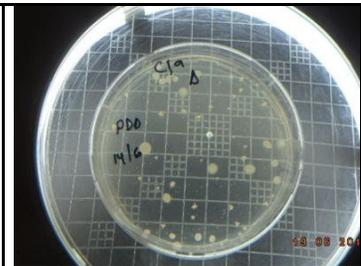


Lecturas de placas en con medio PDA, para determinación de Hongos y Levaduras.

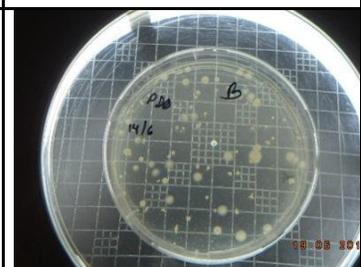


LECTURAS CUARTO DIA

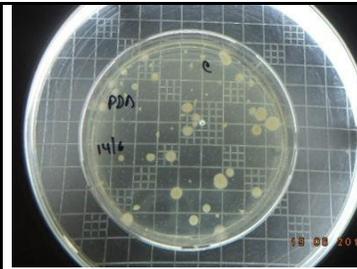
Lecturas de placas en con medio PDA, para determinación de Hongos y Levaduras.



Lecturas de placas en con medio PDA, para determinación de Hongos y Levaduras.



Lecturas de placas en con medio PDA, para determinación de Hongos y Levaduras.

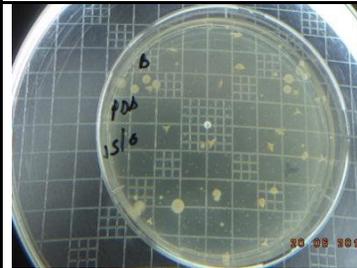


LECTURAS QUINTO DIA

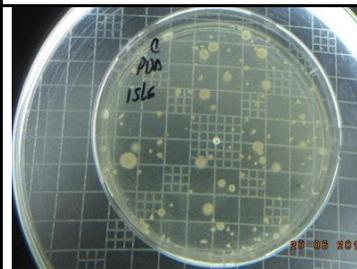
Lecturas de placas en con medio PDA, para determinación de Hongos y Levaduras



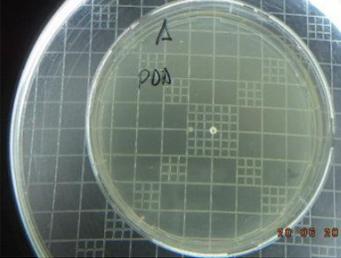
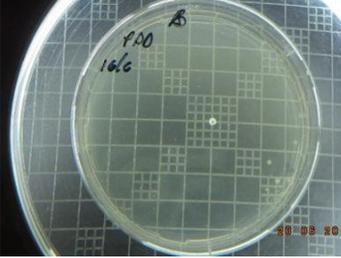
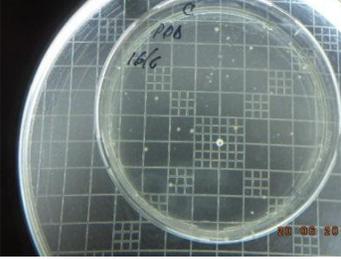
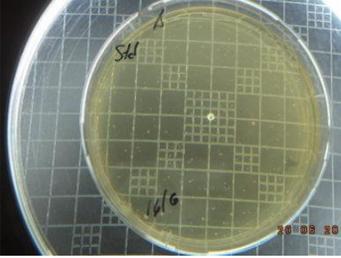
Lecturas de placas en con medio PDA, para determinación de Hongos y Levaduras

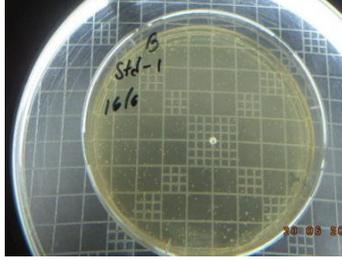
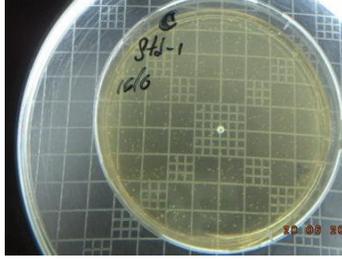
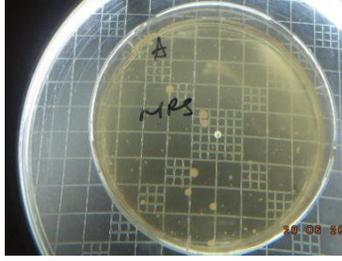
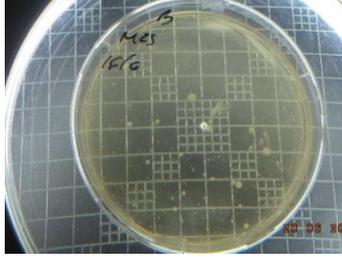
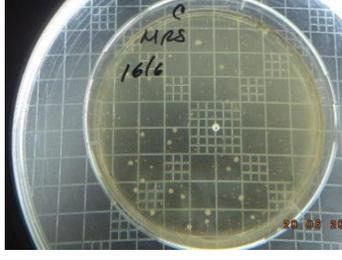


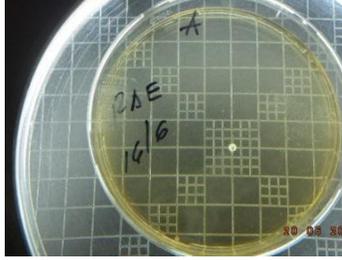
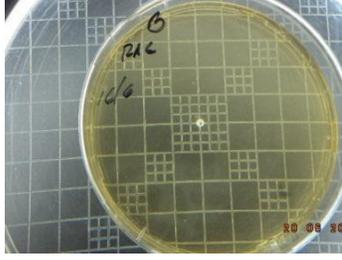
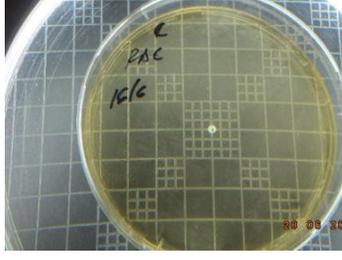
Lecturas de placas en con medio PDA, para determinación de Hongos y Levaduras



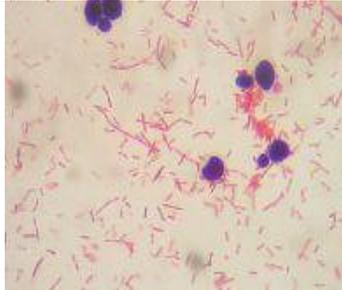
LECTURAS SEXTO DIA

<p>Lecturas de placas en con medio PDA, para determinación de Hongos y Levaduras.</p>	 <p>A petri dish labeled 'A' and 'PDA' containing a Petri Dishes Agar (PDA) medium. A small, white, circular spot is visible in the center of the dish, indicating the presence of fungi or yeast.</p>
<p>Lecturas de placas en con medio PDA, para determinación de Hongos y Levaduras</p>	 <p>A petri dish labeled 'B' and 'PDA' containing a Petri Dishes Agar (PDA) medium. A small, white, circular spot is visible in the center of the dish, indicating the presence of fungi or yeast.</p>
<p>Lecturas de placas en con medio PDA, para determinación de Hongos y Levaduras</p>	 <p>A petri dish labeled 'C' and 'PDA' containing a Petri Dishes Agar (PDA) medium. A small, white, circular spot is visible in the center of the dish, indicating the presence of fungi or yeast.</p>
<p>Lecturas de placas en con medio Stand-1, para determinación Recuento Total de Bacterias (RTB).</p>	 <p>A petri dish labeled 'D' and 'Stand-1' containing a Stand-1 medium. The medium is yellowish and appears turbid, indicating a high concentration of bacteria.</p>

<p>Lecturas de placas en con medio Stand-1, para determinación Recuento Total de Bacterias (RTB).</p>	
<p>Lecturas de placas en con medio Stand-1, para determinación Recuento Total de Bacterias (RTB).</p>	
<p>Lecturas de placas en con medio MRS, para determinación de bacterias Lácticas.</p>	
<p>Lecturas de placas en con medio MRS, para determinación de bacterias Lácticas.</p>	
<p>Lecturas de placas en con medio MRS, para determinación de bacterias Lácticas.</p>	

<p>Lecturas de placas en con medio RAE, para determinación de bacterias Acéticas.</p>	
<p>Lecturas de placas en con medio RAE, para determinación de bacterias Acéticas.</p>	
<p>Lecturas de placas en con medio RAE, para determinación de bacterias Acéticas.</p>	

Microscopias de las tinciones realizadas

<p>Microscopia de una caja en método tradicional, se observan vibrios los que han sido inoculados por los mosquitos oportunistas, y que rondan las cajas donde se está realizando la fermentación.</p>	
--	---

Anexo 2. Formulaciones de Medios de cultivo.

Medio de Lactobacillus MRS.

Peptona proteasa	10.00 g
Extracto de carne	10.00 g
Extracto de levadura	5.00g
Dextrosa	20.00 g
Tween 80	1.00 g
Citrato de amonio	2.00 g
Acetato de Sodio	5.00 g
Sulfato de Magnesio	0.10 g
Sulfato de Manganeso	0.05 g
Fosfato de dipotasio	2.00 g
Agar Bacteriológico	15.00 g
Agua Destilada	1000 ml

Estándar – 1.

Medio para la cuenta total de microorganismos:

Peptona 15.00 g

Extracto de levadura	3.00 g
Cloruro sódico	6.00 g
Agar-Agar	12.00 g
D(+) glucosa	1.00g
Agua Destilada	37 g de medio/1000 ml agua destilada

RAE, para el crecimiento de bacterias acéticas.

Glucosa 3.00 g

Agar bacteriológico	15.00 g
Carbonato de calcio	10.00 g
Azul de bromotinol	0.04g
Alcohol 96°	17.50g
Extracto de levadura	10.00 g
Agua destilada	1000ml

PDA, para determinación de Hongos y Levaduras.

Infusión de de patata 4.00 g

D(+) glucosa 20.00 g

Agar Agar 15.00 g

Agua destilada 39 gramos de medio/1000ml de agua

Análisis físico-químico.

Todos los factores anteriormente citados ejercen un papel significativo sobre la calidad del producto final, por lo que es importante realizar evaluaciones antes y después a las semillas fermentadas en ambas técnicas para determinar en que afecta o beneficia la calidad físico-química de la semilla de cacao en investigación. A continuación se detallan las técnicas que se utilizarán bromatológicamente basados en las técnicas de la AOAC.

✓ **Determinación de proteína, por el método de Kjeldahl según AOAC**

El contenido de nitrógeno de las proteínas varía solo entre unos límites muy estrechos. Para la determinación analítica del contenido de proteína bruta, se determina por lo general el contenido de nitrógeno tras eliminar la materia orgánica, calculándose finalmente el contenido de proteína con ayuda de un factor (en general $F = 6.25$).

La degradación oxidativa acelerada catalíticamente de compuestos orgánicos con ácido sulfúrico a temperaturas comprendidas entre 360 y 410°C se denomina tratamiento Kjeldahl.

Para realizar esta determinación se procederá de la siguiente manera:

A. Aparatos y materiales.

- ✓ Macro Kjeldahl
- ✓ Matraz Kjeldahl de 500 ml
- ✓ Bureta de 25 ml

- ✓ Papel de pesada
- ✓ Probeta de 25 ml
- ✓ Beaker de 100 ml
- ✓ Erlenmeyer de 500 ml

B. Reactivos

- ✓ Acido sulfúrico al 98%
- ✓ Mezcla catalizadora: Sulfato de cobre y sulfato de potasio
- ✓ Hidróxido de sodio al 50%
- ✓ Solución de acido sulfúrico 0.1N
- ✓ Acido bórico al 4%
- ✓ Indicador rojo de metilo y verde de bromocresol

C. Determinación

Se pesan 2 gramos de muestra homogenizada en papel de pesada se somete a tratamiento oxidativo con 25 ml de acido sulfúrico mas 3.9 gramos de mezcla catalizadora, luego al clarificarse la mezcla se agrega 250 ml de agua destilada mas 60 ml de hidróxido de sodio se destila y el amoniaco se atrapa en 40 ml de acido bórico, este se titula y se obtiene la cantidad utilizada en la valoración. Realizar un blanco (se realiza todo menos la muestra).

Calculo

$$P = \frac{(a - b) * 1.0408 * F}{M}$$

Donde

- a:** ml de acido usado en la muestra
- b:** ml de acido usado en el blanco
- F:** Factor de conversión del contenido proteico
- M:** Peso en gramo de la muestra

✓ Determinación de pH

El pH de un alimento se mide con un indicador de color o pH metro. La medición electrométrica con pH metro resulta sencilla y precisa en la actualidad. Los componentes microelectrónicas han hecho posible contar con aparatos pequeños y portátiles de alta calidad con indicadores digitales, algunos de sus electrodos construidos en forma de varilla sumergible. Estos medidores miden la diferencia de potencial entre un electrodo de vidrio entre un electrodo estándar de calomel, que forma parte de un electrodo de combinación y se calibra con soluciones amortiguadoras preparadas comercialmente de pH preciso y conocido.

La medición del pH de un alimento se realiza de forma directa; los alimentos húmedos o semi húmedos se examinan después de hacer una mezcla con agua. Esto es posible debido a que los alimentos en general contienen suficientes sales amortiguadoras que permiten hacer una dilución sin afectar el pH; sin embargo, el contenido relativamente alto

de electrolitos en la fase acuosa de los alimentos no esté presente en soluciones amortiguadoras usadas para calibración de medidor del pH.

✓ **Determinación de humedad**

Método de la estufa de aire

1.- OBJETIVO

Determinar el contenido de agua de la muestra.

2.- ALCANCE Y CAMPO DE APLICACIÓN

El método es aplicable a alimentos sólidos, líquidos o pastosos no susceptibles a degradación al ser sometidos a temperaturas superiores a 105 °C. Este método es inadecuado para productos ricos en sustancias volátiles distintas del agua.

3.- FUNDAMENTO

El método se basa en la determinación gravimétrica de la pérdida de masa, de la muestra desecada hasta masa constante en estufa de aire.

4.- REFERENCIAS

4.1 Instituto Nacional de Normalización, NCh 841 of 78

4.2 Official Methods of Analysis. A.O.A.C. 15th Edition 1990.

5.- MATERIAL Y EQUIPO

5.1.- Balanza analítica, sensibilidad 0.1 mg

5.2.- Cápsulas de vidrio, porcelana o metálica, con tapa

5.3.- Desecador con deshidratante adecuado

5.4.- Estufa regulada a 103 ± 2 °C

5.5.- Material usual de laboratorio

6.- PROCEDIMIENTO

6.1.- Efectuar el análisis en duplicado

6.2.- Colocar la cápsula destapada y la tapa durante al menos 1 hora en la estufa a la temperatura de secado del producto.

✓ **Determinación de grasa**

Procedimiento para calcular grasa

Método Hidrólisis Ácida-Soxhlet

1. OBJETIVO

Determinar la concentración total de materia grasa.

2.- CAMPO DE APLICACIÓN

El método es aplicable a alimentos que han sido sometidos a tratamientos térmicos y para los cuales se desea extraer la totalidad de la grasa.

3.- PRINCIPIO

Una cantidad previamente homogeneizada, medida o pesada del alimento se somete a una hidrólisis ácida con HCL concentrado para separar la materia grasa de los hidratos de carbono o proteínas, la que luego es absorbida por la celite. Posteriormente, se realiza la extracción total de la materia grasa por soxhlet.

4. - REFERENCIAS

4.1.-Official Methods of Analysis A.O.A.C. 15th Edition, U.S.A. (1990)

5.- MATERIAL Y EQUIPO

5.1.- Matraz erlenmeyer de 250 mL

5.2.- Perlas de vidrio

5.3.- Sistema refrigerante

5.4.- Baño termorregulador

5.5.- Sistema de filtración con vacío

5.6.- Papel filtro o dedal de celulosa, pipeta

5.7.- Sistema extractor Soxhlet

5.8.- Manto calefactor o rotavapor

5.9.- Estufa de aire a $103 \pm 2^\circ\text{C}$

5.10.- Balanza analítica

5.11.- Material usual de laboratorio

6.- REACTIVOS

6.1.- Acido clorhídrico conc 37 % p.a

6.2.- Celite

6.3.- Éter de petróleo P.E. 40-60 °C paz

7.- PROCEDIMIENTO

7.1.- Preparación de la muestra:

7.1.1 Pesar en un matraz erlenmeyer de 250 mL entre 2 a 5 gramos de muestra, previamente homogeneizado, adicionar 10 mL de agua y 10 mL de ácido clorhídrico más algunas perlas de ebullición.

7.1.2. Conectar al sistema refrigerante, calentar por 45 minutos, agitando a intervalos de 10 minutos.

7.1.3. Preparar una suspensión que contenga 3 gramos de celite en 20 mL de agua

7.1.4. Una vez terminado el calentamiento, adicionar 1 gramo de celite y agitar.

7.1.5. Proceder a filtrar al vacío por medio de un embudo Buchner con papel filtro, adicionados de la suspensión de celite preparada previamente.

7.1.6. Secar el papel filtro con la celite y la grasa adsorbida en estufa a $103 \pm 2^\circ\text{C}$ por 1 hora y extraer la grasa por Soxhlet.

7.2.- Determinación por Soxhlet 7.2.1.-Incorporar la muestra hidrolizada y seca a un dedal de celulosa o envolver en papel filtro.

7.2.2.- Colocar el dedal en el tubo de extracción y adicionar el solvente al matraz previamente tarado.

7.2.3.- Extraer la muestra con solvente por 6 a 8 horas a una velocidad de condensación de 3-6 gotas/seg.

7.2.4.- Cuando se completa la extracción eliminar el solvente en rotavapor o evaporando con precaución bajo campana, hasta que se evapore todo el éter.

7.2.5.- Secar el matraz en estufa a $103 \pm 2^\circ\text{C}$ por 30 min, enfriar en desecador y pesar.

8.- CÁLCULO Y EXPRESION DE RESULTADOS

$$\% \text{ grasa cruda} = \frac{m_2 - m_1}{M} \times 100$$

Donde: m peso de la muestra

m1 tara del matraz solo

m2 peso matraz con grasa.

Los resultados se informan en % de materia grasa.

Promediar los valores obtenidos y expresar el resultado con 2 decimales.

Repetibilidad: La diferencia de los 2 resultados no debe ser superior al 2 % del promedio

Procedimiento para calcular fibra cruda

Método gravimétrico

1.0. OBJETIVO

Determinar fibra cruda en diversos tipos de alimentos.

2.0. CAMPO DE APLICACION

El método es aplicable a granos, platos preparados, harinas, alimentos para animales, materiales que contienen fibra de los cuales la grasa ha sido extraída para dejar un residuo adecuado. Fibra cruda es la pérdida de masa que corresponde a la incineración del residuo orgánico que queda después de la digestión con soluciones de ácido sulfúrico e hidróxido de sodio en condiciones específicas.

4.0. REFERENCIAS

4.1. - Official Methods of Analysis. A.O.A.C. 15 th Edition. U.S.A. (1990).

4.2. - Manuals of food quality control. FAO Food Nutrition Paper 14/7. Roma (1986).

5.0. MATERIALES, INSUMOS Y EQUIPOS

5.1. Materiales y Equipos

5.1.1. Aparato de calentamiento a reflujo.

5.1.2. Balanza analítica, sensibilidad 0,1 mg.

5.1.3. Crisoles de porcelana o de sílica.

5.1.4. Desecador con deshidratante adecuado (silicagel con indicador u otro).

5.1.5. Dispositivo de succión al vacío.

5.1.6. Embudo Büchner de polipropileno tipo California u otra alternativa equivalente.

5.1.7. Estufa a 103 ± 2 °C.

5.1.8. Tamiz de malla 1 mm.

5.1.9. Placa calefactora capaz de llevar 200 ml de agua a 25 °C. Hasta ebullición en 15 + 2 min.

5.1.10. Material usual de laboratorio.

5.2. Reactivos

5.2.1. Solución de ácido sulfúrico 0.255 N (1.25 g de H₂SO₄ / 100 ml). La concentración debe ser chequeada por titulación.

5.2.2. Solución de hidróxido de sodio 0.313 N (1,25 g de NaOH / 100 de agua libre de Na₂CO₃). La concentración debe ser chequeada por titulación.

5.2.3. Fibra cerámica: Cerafiber, 8 lb/cu ft. Colocar 60 g en una juguera, agregar 800 ml de agua y mezclar por un minuto a baja velocidad. Determinar el blanco tratando aproximadamente 2 g (peso seco) de la fibra cerámica preparada con ácido y álcalis como en la determinación

(6.2), Corregirlos resultados de fibra cruda por el blanco, el cual debe ser insignificante (aproximadamente 2 mg).

5.2.4. Silicona Antiespumante.

5.2.5. Etanol al 95%.

5.2.6. Éter de petróleo, P.E. 40 – 60 °C.

6.0. DESARROLLO DEL PROCESO

6.1. Preparación de la muestra

6.1.1. Homogeneizar, secar 103 ± 2 °C en estufa de aire o a 70 °C al vacío, de acuerdo a las técnicas indicadas en la referencia, considerando el tipo de muestra. Moler la muestra.

6.1.2. Pasar por un tamiz de malla de 1 mm.

6.1.3. Extraer con éter de petróleo sí el contenido de grasa es superior al 1.

6.2.- Determinación

6.2.1. Realizar el análisis en duplicado.

6.2.2. Pesar a 0.1 mg alrededor de 2 g de muestra preparada y transferir en al matraz del aparato de calentamiento a reflujo. Registrar s

6.2.3. Agregar 1.5 a 2.0 g de fibra cerámica preparada.

6.2.4. Agregar 200 ml de H₂SO₄ 0.255 N, hirviendo, gotas de antiespumante y perlas de vidrio.

6.2.5. Conectar el aparato de calentamiento a reflujo y hervir exactamente durante 30 minutos, rotando el matraz periódicamente.

6.2.6. Desmontar el equipo y filtrar a través del embudo Büchner tipo California o sus alternativas.

6.2.7. Lavar con 50 a 75 ml de agua hirviendo, repetir el lavado con 3 porciones de 50 ml de agua o hasta que cese la reacción ácida.

6.2.8. Retornar el residuo al aparato de calentamiento a reflujo y hervir exactamente durante 30 minutos, rotando el matraz periódicamente.

6.2.9. Lavar con 25 ml de H₂SO₄ 0.255 N, hirviendo, con 3 porciones de 50 ml de agua hirviendo y con 25 ml de etanol al 95%.

6.2.10. Remover el residuo y transferir al crisol.

6.3.10. Secar en estufa a 130 + 2 °C por 2 horas, enfriar en desecador y pesar.

6.3.11. Incinerar 30 minutos a 600 + 15 °C, enfriar en desecador y pesar.

6.3.12. Determinar un blanco en las mismas condiciones que la muestra.

7.0 EXPRESIÓN DE RESULTADOS

% Fibra cruda en muestra molida = $C = (\text{Pérdida de peso en la incineración} - \text{pérdida de peso del blanco de fibra cerámica}) \times 100 / \text{peso de la muestra}$.

%Fibra cruda (base húmeda) = $C \times 100 - \% \text{ Humedad muestra original}$. 100

Promediar los valores obtenidos y expresar el resultado con dos decimales.

Repetibilidad: La diferencia de los resultados no deberá ser superior al 5 % del promedio. Informar él % de fibra al 0,1 %, sobre la base de la muestra original considerando que ha sido desgrasada en el caso de contener más de 1 % de grasa.

Glosario

1. **Tanino:** Se extraen de las plantas con agua o con una mezcla de agua y alcohol, que luego se decanta y se deja evaporar a baja temperatura hasta obtener el producto final. Los taninos tienen un ligero olor característico, sabor amargo y astringente, y su color va desde el amarillo hasta el castaño oscuro.
2. **Brix:(símbolo °Bx):** sirven para determinar el cociente total de sacarosa disuelta en un líquido.
3. **Ácido acético:** se puede encontrar en forma de ion acetato. Éste es un ácido que se encuentra en el vinagre, siendo el principal responsable de su sabor y olor agrios.
4. **Perennifolio:** procede del latín perennis, duradero, perenne, y de folium, hoja. Esta flora también recibe el nombre de sempervirente o siempre verde ya que, pese a que existe en zonas de estaciones frías, siempre mantiene el follaje.
5. **Pecíolo:** es la parte de la hoja que une el limbo a la rama. Tiene forma de rabito y, a través de él, discurren los vasos conductores.
6. **Verticilo:** conjunto de tres o más hojas, ramas u otros órganos que brotan de un tallo en el mismo nivel.
7. **Ecotipo:** es una subpoblación genéticamente diferenciada que está restringida a un hábitat específico, un ambiente particular o un ecosistema definido, con unos límites de tolerancia a los factores ambientales.

8. **Mesocarpio:** Es la parte de la fruta que se consume normalmente y es resultado de la transformación de la pared ovárica de la flor, por lo que habitualmente envuelve al endocarpio que a su vez envuelve a las semillas.
9. **Inoculos:** Es una suspensión de microorganismos vivos que se han adaptado para reproducirse en un medio específico.
10. **anaerobios o anaeróbicos:** son los que no utilizan oxígeno (O_2) en su metabolismo, más exactamente que el aceptor final de electrones es otra sustancia diferente del oxígeno. Si el aceptor de electrones es una molécula orgánica (piruvato, acetaldehído, etc.) se trata de metabolismo fermentativo; si el aceptor final es una molécula inorgánica distinta del oxígeno (sulfato, carbonato, etc.) se trata de respiración anaeróbica
11. **aerobios o aeróbicos:** son los organismos que pueden vivir o desarrollarse en presencia de oxígeno diatómico, mientras que si lo necesitan se denominan aerobios estrictos. El adjetivo "aerobio" se aplica no sólo a organismos sino también a los procesos implicados ("metabolismo aerobio") y a los ambientes donde se realizan. Un "ambiente aerobio" es aquel rico en oxígeno, a diferencia de uno anaerobio, donde el oxígeno está ausente, o uno microaerófilico, donde el oxígeno se encuentra a muy baja concentración.
12. **microaerofilia:** hace referencia a las condiciones de baja y estricta concentración de oxígeno que requieren determinados organismos para su desarrollo, conocidos como microaerófilos.