

ORIGINAL

Modulation of the sensory and chemical profiles of cocoa liquor (*Theobroma cacao* L.) through efficient microorganisms and fruit extracts in fermented beans of the CCN-51 and Nacional varieties

Modulación de los perfiles sensorial y químico del licor de cacao (*Theobroma cacao* L.) mediante microorganismos eficientes y extractos frutales en almendras fermentadas de las variedades CCN-51 y Nacional

Luis Humberto Vásquez Cortez^{1,2}  , Silvia Cristina Clavijo Velázquez¹  , Sanyi Lorena Rodríguez Cevallos^{3,4}  , Manuel Danilo Carrillo Zenteno⁵  , Carol Daniela Coello Loo³  

¹Facultad de Ciencias Aplicadas a la Industria, Universidad Nacional de Cuyo. San Rafael, M5600APG, Argentina.

²Universidad Técnica de Babahoyo, Facultad de Ciencias Agropecuarias, Carrera de Agroindustria. Babahoyo, Los Ríos, Ecuador.

³Facultad de Ciencias de la Industria y Producción, Carrera Alimentos, Universidad Técnica Estatal de Quevedo. Los Ríos, Ecuador.

⁴Facultad de Posgrados Maestría En Ciencia Y Tecnología De Alimentos, Universidad Estatal de Milagro. Ecuador.

⁵Instituto Nacional de investigaciones agropecuarias (INIAP). Ecuador.

Citar como: Vásquez Cortez LH, Clavijo Velázquez SC, Rodríguez Cevallos SL, Carrillo Zenteno MD, Coello Loo CD. Modulation of the sensory and chemical profiles of cocoa liquor (*Theobroma cacao* L.) through efficient microorganisms and fruit extracts in fermented beans of the CCN-51 and Nacional varieties. Salud, Ciencia y Tecnología. 2025; 5:2509. <https://doi.org/10.56294/saludcyt20252509>

Enviado: 08-06-2025

Revisado: 05-08-2025

Aceptado: 29-10-2025

Publicado: 30-10-2025

Editor: Prof. Dr. William Castillo-González 

Autor para la correspondencia: Luis Humberto Vásquez Cortez 

ABSTRACT

Introduction: cocoa fermentation is a key biotechnological process that defines the chemical and sensory quality of the liquor. The incorporation of efficient microorganisms (EM) and fruit extracts has been proposed as a strategy to modulate fermentative metabolism and enhance the attributes of the final product.

Method: two cocoa varieties (CCN-51 and Nacional) were evaluated under a three-factor design with different EM concentrations (0, 40, and 80 %) and diluted extracts of banana, passion fruit, and jackfruit. Physicochemical variables (pH, titratable acidity, moisture, ash, protein, and energy) and sensory attributes (color, appearance, aroma, flavor, and aftertaste) were analyzed using ANOVA and interaction tests.

Results: pH and acidity showed highly significant differences for EM% and its interaction with the extracts, indicating greater lactic-acid and acetic-oxidative activity. Moisture was modulated by the combined action of EM and fruit matrices, particularly in treatments with passion fruit and banana. Ash content showed effects only in interactions, while protein and energy depended mainly on the genotype. Sensory analysis revealed that CCN-51 developed darker tones, satin surfaces, and fruity-cocoa profiles, whereas Nacional exhibited toasted, bitter notes and more persistent aftertastes.

Conclusions: the co-application of EM and fruit extracts significantly modulated the biochemical profile and sensory expression of the cocoa liquor, with contrasting responses between varieties. These findings support the use of combined bioprocesses to optimize functional and organoleptic attributes for specialty cocoa markets.

Keywords: Controlled Fermentation; Microbial Inoculants; Fruit-Based Matrices; Sensory Properties; Postharvest Quality; Cocoa Genotypes.

RESUMEN

Introducción: la fermentación del cacao es un proceso biotecnológico clave que define la calidad sensorial y química del licor. La incorporación de microorganismos eficientes (EM) y extractos frutales se ha propuesto como una estrategia para modular el metabolismo fermentativo y mejorar los atributos del producto final.

Método: se evaluaron dos variedades de cacao (CCN-51 y Nacional) bajo un diseño trifactorial con diferentes concentraciones de EM (0, 40 y 80 %) y extractos diluidos de banano, maracuyá y jackfruit. Se analizaron variables fisicoquímicas (pH, acidez titulable, humedad, ceniza, proteína y energía) y sensoriales (color, aspecto, aroma, sabor y regusto), mediante ANOVA y pruebas de interacción.

Resultados: el pH y la acidez mostraron diferencias altamente significativas para EM% y su interacción con los extractos, evidenciando una mayor actividad ácido-láctica y acético-oxidativa. La humedad fue modulada por la acción combinada de los EM y las matrices frutales, especialmente en tratamientos con maracuyá y banano. La ceniza presentó efectos solo en interacciones, mientras que proteína y energía dependieron principalmente del genotipo. Sensorialmente, CCN-51 mostró tonalidades más oscuras, superficies satinadas y perfiles frutales-cacao, mientras Nacional presentó notas tostadas, amargas y regustos más persistentes.

Conclusiones: la coaplicación de EM y extractos frutales moduló de forma significativa la bioquímica y el perfil sensorial del licor, con respuestas contrastantes según la variedad. Estos resultados respaldan el uso de bioprocesos combinados para optimizar atributos funcionales y organolépticos en mercados de cacao de especialidad.

Palabras clave: Fermentación Controlada; Inóculos Microbianos; Matrices Frutales; Propiedades Sensoriales; Calidad Poscosecha; Genotipos de Cacao.

INTRODUCCIÓN

El cacao (*Theobroma cacao* L.) es una especie arbórea cultivada principalmente en regiones tropicales, cuyas plantaciones generan un alto impacto económico, social y sensorial. Los granos o almendras de cacao, obtenidos de los frutos del árbol, constituyen la materia prima esencial para la elaboración de licor y chocolate, productos cuyo valor en los mercados internacionales depende directamente de la calidad alcanzada durante el proceso de fermentación y poscosecha. Este cultivo representa, además, un pilar fundamental en la sostenibilidad de las economías rurales y en la conservación de la biodiversidad tropical. La fermentación es considerada la fase más determinante en el desarrollo del perfil organoléptico del cacao, ya que en este proceso se generan precursores bioquímicos que darán lugar a notas aromáticas y gustativas diferenciadas durante el tostado y refinado.⁽¹⁾ En este contexto, Ecuador se posiciona como uno de los principales referentes en la producción de cacao fino y de aroma⁽²⁾, destacándose particularmente las variedades Nacional y CCN-51, las cuales presentan contrastes relevantes en composición química, respuesta fermentativa y atributos sensoriales.⁽³⁾

La fermentación tradicional depende de microbiota espontánea y condiciones ambientales variables, lo que puede generar inconsistencias en la expresión de compuestos volátiles, ácidos orgánicos, fenoles, alcaloides y péptidos relacionados con el aroma y sabor del licor de cacao.⁽⁴⁾ Por ello, ha surgido un creciente interés en la aplicación de enfoques biotecnológicos que permitan dirigir y potenciar las rutas metabólicas implicadas en la formación de perfiles químicos y sensoriales deseables.⁽⁵⁾ Entre estas estrategias, el uso de consorcios de microorganismos eficientes (EM) se ha convertido en una alternativa prometedora, dado su potencial para optimizar la degradación del mucílago, incrementar la síntesis de alcoholes, aldehídos y ésteres, y favorecer procesos enzimáticos esenciales durante la fermentación controlada.⁽⁶⁾

Paralelamente, la incorporación de extractos frutales como coadyuvantes fermentativos ofrece ventajas adicionales, ya que aportan carbohidratos fermentables, compuestos fenólicos, minerales y ácidos orgánicos que pueden estimular la actividad microbiana y modificar positivamente la generación de compuestos volátiles.⁽⁷⁾ Este enfoque combinado ha mostrado potencial para influir tanto en los atributos sensoriales como sabor, acidez, persistencia aromática, notas florales o frutales como en la composición química del licor, lo que impacta directamente en la percepción del consumidor y en la valorización comercial de productos derivados del cacao.⁽⁸⁾

El licor de cacao constituye una matriz compleja, donde componentes como teobromina, catequinas, lípidos, proteínas, azúcares y precursores aromáticos interactúan para dar lugar a perfiles sensoriales específicos. Diversos estudios recientes han evidenciado que las modificaciones inducidas durante la fermentación pueden generar diferencias significativas entre variedades y tratamientos, especialmente cuando se emplean microorganismos seleccionados o sustratos complementarios.⁽⁹⁾ No obstante, la mayoría de investigaciones se ha centrado en procesos tradicionales o en un solo tipo de intervención, dejando un vacío respecto a los efectos combinados de consorcios microbianos y extractos frutales en variedades contrastantes como CCN-51 y Nacional.

En este contexto, resulta pertinente analizar cómo la aplicación conjunta de microorganismos eficientes y extractos frutales influye en los perfiles sensorial y químico del licor de cacao obtenido a partir de almendras fermentadas.⁽¹⁰⁾ Comprender estas interacciones permite no solo optimizar la calidad organoléptica, sino también fortalecer la competitividad en mercados que exigen productos diferenciados, consistentes y con

identidad de origen. Además, este tipo de investigaciones contribuye al diseño de modelos fermentativos sostenibles, transferibles a pequeña y mediana escala, con proyección hacia la industria chocolatera de alto valor.

En consecuencia, el presente estudio tiene como objetivo evaluar el perfil sensorial del licor de cacao elaborado a partir de las almendras fermentadas de tipo CNN-51 y Nacional, tratados con consorcio de microorganismos eficientes (EM) y extractos de frutas, con el fin de determinar su influencia en las características organolépticas del producto final. Este enfoque permite generar evidencia científica aplicable a sistemas agroindustriales innovadores orientados a la mejora integral del producto, en concordancia con las tendencias actuales de la investigación en alimentos funcionales, biotecnología fermentativa y calidad sensorial.

MÉTODO

Localización y condiciones ambientales

Este estudio se realizó en las instalaciones del Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias (INIAP) en la Estación Experimental Tropical Pichilingue, ubicado en el cantón Mocache, cuyas coordenadas geográficas son: Lat: 1° 4' 26.00" y Long: 79° 29' 20.47", a una altitud de 73 metros sobre el nivel del mar, donde se efectuó la fermentación de cacao obtenido en Santa Rosa, Provincia del Oro, sus coordenadas geográficas son: Lat: 3° 23' 41.9" y Long: 79° 50' 23.6", y en la Provincia de Manabí, Parroquia La Pipona, cantón Rocafuerte siendo sus coordenadas: Lat: 0° 52' 06.0" S" y Long: 80° 27' 41.2" O.

Se desarrolló la toma de las variables correspondientes a los análisis fisicoquímicos en el laboratorio de Bromatología del Campus "La María", ubicado en los predios de la Universidad Técnica Estatal de Quevedo, este laboratorio se encuentra en el Kilómetro 7 vía Quevedo-El Empalme, Recinto San Felipe, cantón Mocache, con coordenadas geográficas de 01° 06' 00" de latitud Sur y 79° 29' 00" de longitud Oeste con una altitud de 73 metros sobre el nivel del mar con una temperatura media de 25,8 °C.

La obtención de las frutas para la elaboración de los extractos diluidos se recolectó bajo pedido en el Recinto el Naranjo, perteneciente al cantón Mocache de la Provincia de los Ríos; sus coordenadas geográficas son: Lat: 1° 11' 30.7" y Long: 79° 35' 43.6".

La elaboración de la pasta de cacao del producto final se elaboró en el Taller de Agroalimentos, sección de Confites y Chocolatería, el cual pertenece al Campus "La María" predios de la misma Universidad.

Los análisis químicos para evaluación de la pasta de cacao, se realizaron en el laboratorio de Biotecnología Industrial y Alimentaria, de la Universidad de las Fuerzas Armadas del Ecuador ESPE - Sede Santo Domingo de los Tsáchilas, cuyas coordenadas geográficas de 0° 24' 47" de latitud sur y 79° 18' 34" de longitud oeste a 625 metros sobre nivel del mar, posee una temperatura alrededor de 22-23 °C, determinado las variables de pH, porcentaje de acidez, humedad y ceniza.

Diseño de la Investigación

En el presente trabajo de investigación se empleó un Diseño Completamente al Azar bifactorial (DCA) conformado por 24 tratamientos con 3 repeticiones, dando un total de 72 objetos de estudio. Como primer factor, los tipos de cacao (*Theobroma cacao* L.), representados por dos materiales genéticos ampliamente cultivados en Ecuador: CCN-51 y Nacional como segundo factor, la aplicación de microorganismos eficientes (0 % 0 mL (testigo), 40 % (400 mL), 80 % (800 mL) por un kilo de masa fermentativa de producto líquido respectivamente, y finalmente el tercer factor, se evaluó tres tipos de extracto de frutas adicionando un control sin extracto diluido. Se utilizaron extractos de banana, jackfruit y maracuyá, cada extracto fue preparado a una concentración del 3 % (30 mL) para su uso en el estudio.

Diseño Estadístico

Para el debido análisis se utilizó el software Infostat. De este modo, se aseguran estimaciones estadísticas robustas y científicamente fundamentadas y el programa R Studio para elaborar las figuras del análisis sensorial. El presente estudio se desarrolló bajo el método experimental, con el fin de contrastar los factores experimentales, empleando un diseño experimental y un esquema de ANDEVA. El análisis estadístico de los datos se realizó mediante un ANOVA y las diferencias entre las medias fueron determinadas por la prueba de rangos múltiples de Tukey, a un nivel de significancia de $p \leq 0,05$.

Tipo de diseño experimental

Para el análisis estadístico se empleó el siguiente modelo matemático denominado diseño completamente al azar trifactorial que se observa en la ecuación 1.

Ecuación 1. Modelo matemático

$$Y_{ijk} = \mu + \alpha_i + \beta_j + (\alpha\beta)_{ij} + E_{ijk}$$

Donde:

μ = Es el efecto de la media.

α_i = Es un efecto de nivel “i-ésimo” del factor A.

β_j =Es un efecto del nivel “jota-ésimo” del factor B.

$(\alpha.\beta)_{ij}$ =Es un efecto debido a la interacción del “i-ésimo” nivel del factor A con el “jota-ésimo” nivel del factor B.

E_{ijk} = Es un efecto aleatorio.⁽¹¹⁾

Esquema de ANDEVA

La tabla 1 presenta el análisis de varianza (ANDEVA), en el que se incluyen los tratamientos, los factores evaluados y las interacciones entre ellos, proporcionando una base estadística para la interpretación de los efectos principales y combinados del modelo experimental.

Tabla 1. Esquema de ANDEVA		
Fuentes de variación (FV)		Grados de libertad (GL)
Tratamientos	axb-1	71
Repeticiones	r-1	2
Factor cacao	(TP-1)	1
Factor ME	(ME-1)	2
Factor Extractos de frutas	(Ef-1)	3
Cacao * Factor ME	(Tp-1)(ME-1)	2
Cacao*Extractos de frutas	(TP-1)(Ef-1)	3
EM*Extracto de frutas		6
Cacao*Factor EM*Extractos de Frutas	(TP-1)(ME-1)(Ef-1)	6
Error Experimental	(Tp*ME*Ef) (r-1)	47
Total	Me*EM*Ef r-1	71

Factores de estudio

La tabla 2 detalla la estructura del diseño experimental, conformado por tres factores principales. El Factor A corresponde a los tipos de cacao y está representado por las variedades CCN-51 y Nacional. El Factor B contempla los niveles de aplicación de microorganismos eficientes (EM), distribuidos en tres concentraciones: 0 %, 40 % y 80 %. Finalmente, el Factor C incluye los diferentes extractos frutales utilizados como coadyuvantes fermentativos, los cuales abarcan cuatro condiciones: sin extracto, banana, jackfruit y maracuyá.

Esta combinación factorial permite evaluar los efectos individuales y las posibles interacciones entre las variedades de cacao, los niveles de microorganismos eficientes y los extractos diluidos de frutas sobre las variables de respuesta consideradas en la investigación.

Tabla 2. Factores y niveles de estudio				
FACTOR A Tipos de cacao	FACTOR B Porcentaje de microorganismos eficientes	FACTOR C Extracto diluido de frutas		
		0 %		Sin extracto de frutas
CCN-51	Niveles	40 %	Niveles	Banana Jackfruit
Nacional		80 %		Maracuyá

Combinación de los tratamientos

La tabla 3 organiza los 24 tratamientos evaluados mediante un sistema de codificación que permite identificar con precisión cada combinación experimental. La estructura facilita el ordenamiento de las unidades de estudio y su asignación durante el proceso de fermentación. Esta distribución codificada optimiza el análisis comparativo de los tratamientos y garantiza la trazabilidad de los resultados obtenidos.

Tabla 3. Arreglo de tratamientos de estudios

N°	Código	TIPOS DE CACAO	Porcentaje de microorganismos eficientes	Extracto diluido de frutas
1	ccEM ₀ Ef ₀	CCN-51	0	Sin extracto diluido de fruta
2	ccEM ₀ Ef ₁	CCN-51	0	Banana
3	ccEM ₀ Ef ₂	CCN-51	0	Jackfruit
4	ccEM ₀ Ef ₃	CCN-51	0	Maracuyá
5	ccEM ₁ Ef ₀	CCN-51	40	Sin extracto diluido de frutas
6	ccEM ₁ Ef ₁	CCN-51	40	Banana
7	ccEM ₁ Ef ₂	CCN-51	40	Jackfruit
8	ccEM ₁ Ef ₃	CCN-51	40	Maracuyá
9	ccEM ₂ Ef ₀	CCN-51	80	Sin extracto diluido de fruta
10	ccEM ₂ Ef ₁	CCN-51	80	Banana
11	ccEM ₂ Ef ₂	CCN-51	80	Jackfruit
12	ccEM ₂ Ef ₃	CCN-51	80	Maracuyá
13	naEM ₀ Ef ₀	NACIONAL	0	Sin extracto diluido de fruta
14	naEM ₀ Ef ₁	NACIONAL	0	Banana
15	naEM ₀ Ef ₂	NACIONAL	0	Jackfruit
16	naEM ₀ Ef ₃	NACIONAL	0	Maracuyá
17	naEM ₁ Ef ₀	NACIONAL	40	Sin extracto diluido de frutas
18	naEM ₁ Ef ₁	NACIONAL	40	Banana
19	naEM ₁ Ef ₂	NACIONAL	40	Jackfruit
20	naEM ₁ Ef ₃	NACIONAL	40	Maracuyá
21	naEM ₂ Ef ₀	NACIONAL	80	Sin extracto diluido de fruta
22	naEM ₂ Ef ₁	NACIONAL	80	Banana
23	naEM ₂ Ef ₂	NACIONAL	80	Jackfruit
24	naEM ₂ Ef ₃	NACIONAL	80	Maracuyá

Procedimiento experimental

Ejecución de la postcosecha

Obtención de la mazorca de cacao (Materias prima)

Durante la recolección de las mazorcas de cacao, es fundamental garantizar que los frutos seleccionados se encuentren en óptimas condiciones, evitando estrictamente la cosecha de aquellos que presenten signos de contaminación por Moniliasis (*Moniliophthora roreri*):

Para garantizar 72 unidades experimentales de 1 kg de masa fresca cada una, se asignaron 36 kg a la variedad CCN-51 y 36 kg a la variedad Nacional. Con base en rendimientos promedio reportados para almendras frescas (0,12 kg por mazorca en CCN-51 y 0,10 kg en Nacional), se estimaron aproximadamente 300 y 360 mazorcas, respectivamente. Para compensar la variabilidad fisiológica y asegurar la disponibilidad del material biológico, se consideró un margen adicional del 10 %, resultando en 330 mazorcas de CCN-51 y 400 mazorcas de Nacional, equivalentes a 730 frutos en total.

Despulpado

Una vez obtenidas las mazorcas requeridas, se llevó a cabo el proceso de despulpado, el cual consiste en separar las almendras de cacao de la placenta del fruto.

Asimismo, se procedió a efectuar un corte longitudinal o transversal en las mazorcas para facilitar la extracción de las almendras de cacao.

Una vez despulpadas, las almendras de cacao fueron separadas y los granos se almacenaron en recipientes limpios y adecuadamente acondicionados.

Las almendras se colocaron en las celdas de las cajas micro fermentadoras.

Manejo de Experimento

Proceso de fermentación

Posteriormente, las almendras de cacao se colocaron en cajas micro fermentadoras, cada una con capacidad para albergar 1kg de masa fresca de cacao⁽¹²⁾ fabricadas de guayacán blanco, con capacidad total de 36 espacios y sus dimensiones fueron de 125x175x10 centímetros. Se ocuparon dos cajas en su totalidad 72 celdas, utilizando 1 kg de almendras en cada cuadro, separando los tratamientos control. El proceso involucró un total de 72 kg de masa fresca de almendras de cacao.⁽¹³⁾ Las etapas de fermentación tuvieron una duración de 5 días.⁽¹⁴⁾

Aplicación de microorganismos eficientes

Se llevó a cabo la inducción de microorganismos eficientes (Albiobacth) en las almendras frescas de cacao, siguiendo las especificaciones de un croquis experimental. Este diseño incluye las dosis precisas establecidas para cada tratamiento y las respectivas repeticiones, garantizando la uniformidad y el rigor metodológico durante el proceso experimental.⁽⁵⁾

Albiobacth

Se utilizó microorganismos Albiobacth (Nombre comercial), su contenido es poseedor de bacterias: 13,x10⁷ Unidad Formadora de Colonia /mL, mientras que las levaduras alcanzan los 40,x10⁶ UPC/mL. Los microorganismos identificados incluyen a *Lactobacillus acidophilus*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Rhizobium japonicum* y *Azotobacter Chroococcum*.⁽⁵⁾

Porcentaje de aplicación de microorganismos eficientes

Siguiendo la metodología descrita por Vásquez⁽¹⁾ se calculó la cantidad de microorganismos Albiobacth a aplicar, utilizando microorganismos eficientes en las siguientes proporciones 0 % (control), 40 % (400 mL), 80 % (800 mL). Estas dosis se aplicó por cada kilogramo de masa fermentativa de productos líquido, asegurando la adecuada distribución según los tratamientos establecidos.⁽¹⁵⁾

Preparación de extracto diluido de frutas banana

El extracto de banana (*Musa spp.*) (guineo) se preparó como se observa en la figura 1 del diagrama lo cual se procedió a utilizar cuatro frutos en estado de madurez avanzada “Madura”, con un peso promedio de 150 g cada uno. De esta cantidad se obtuvieron 150 g de pulpa, los cuales se licuaron con 200 mL de agua destilada a temperatura controlada, inferior a 40 °C +/- 2 °C.⁽¹⁶⁾

La proporción final correspondió a un 42,85 % de fruta en la mezcla, valor obtenido mediante la aplicación de la formula correspondiente y siguiendo la metodología descrita por Viera.⁽¹⁷⁾ Esta misma ecuación 2 del porcentaje de fruto, se empleó de manera análoga para el cálculo de la proporción en los extractos elaborados con las demás frutas evaluadas (banana, jackfruit y maracuyá).

Ecuación 2. Porcentaje de fruto

$$\text{Fruta \%} = \frac{\text{g de pulpa}}{\text{g de pulpa} + \text{mL de agua}} \times 100$$

Para la obtención del extracto diluido de banana, se utilizó la fruta en estado de madurez avanzado “Madura”, caracterizada por un tono amarillo.⁽¹⁸⁾

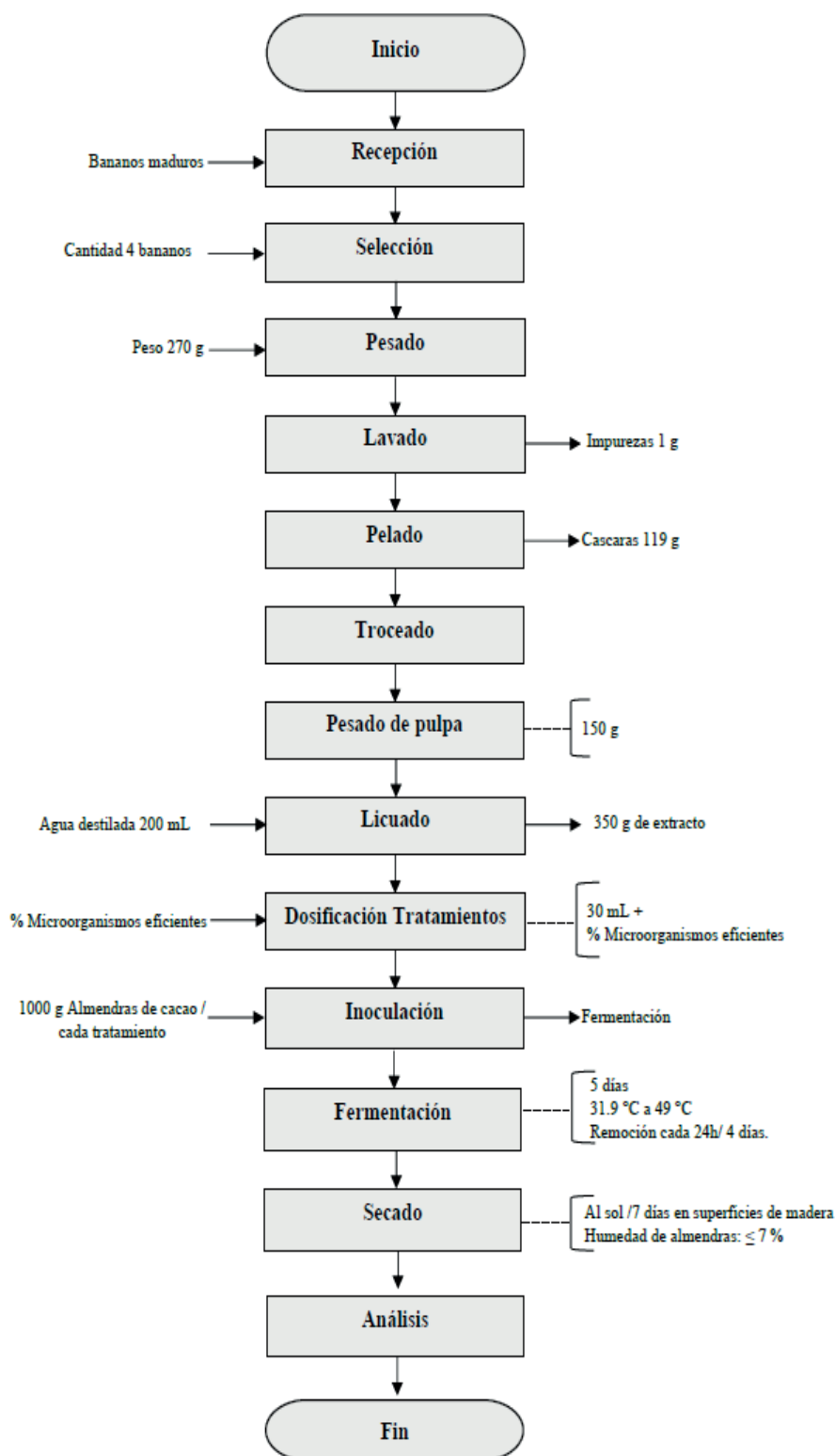


Figura 1. Diagrama del proceso de obtención y aplicación del extracto diluido de banano en la fermentación y secado de cacao

Preparación de extracto de frutas jackfruit

La obtención del extracto diluido de jackfruit (*Artocarpus heterophyllus*) se visualiza en la figura 2 el cual fué obtenido a partir de un extracto natural en una concentración de 3 % (30 mL), con el objetivo de evaluar su efecto en la mejora de la calidad del grano de cacao durante el proceso de fermentación. Paralelamente, se preparó un licuado a base de pulpa de Jackfruit, para lo cual se empleó 2700 g de fruta fresca, de los cuales se procesaron 150 g de pulpa, mezclándolos con 200 mL de agua destilada, siguiendo las metodologías propuesta por Vázquez⁽¹⁹⁾.

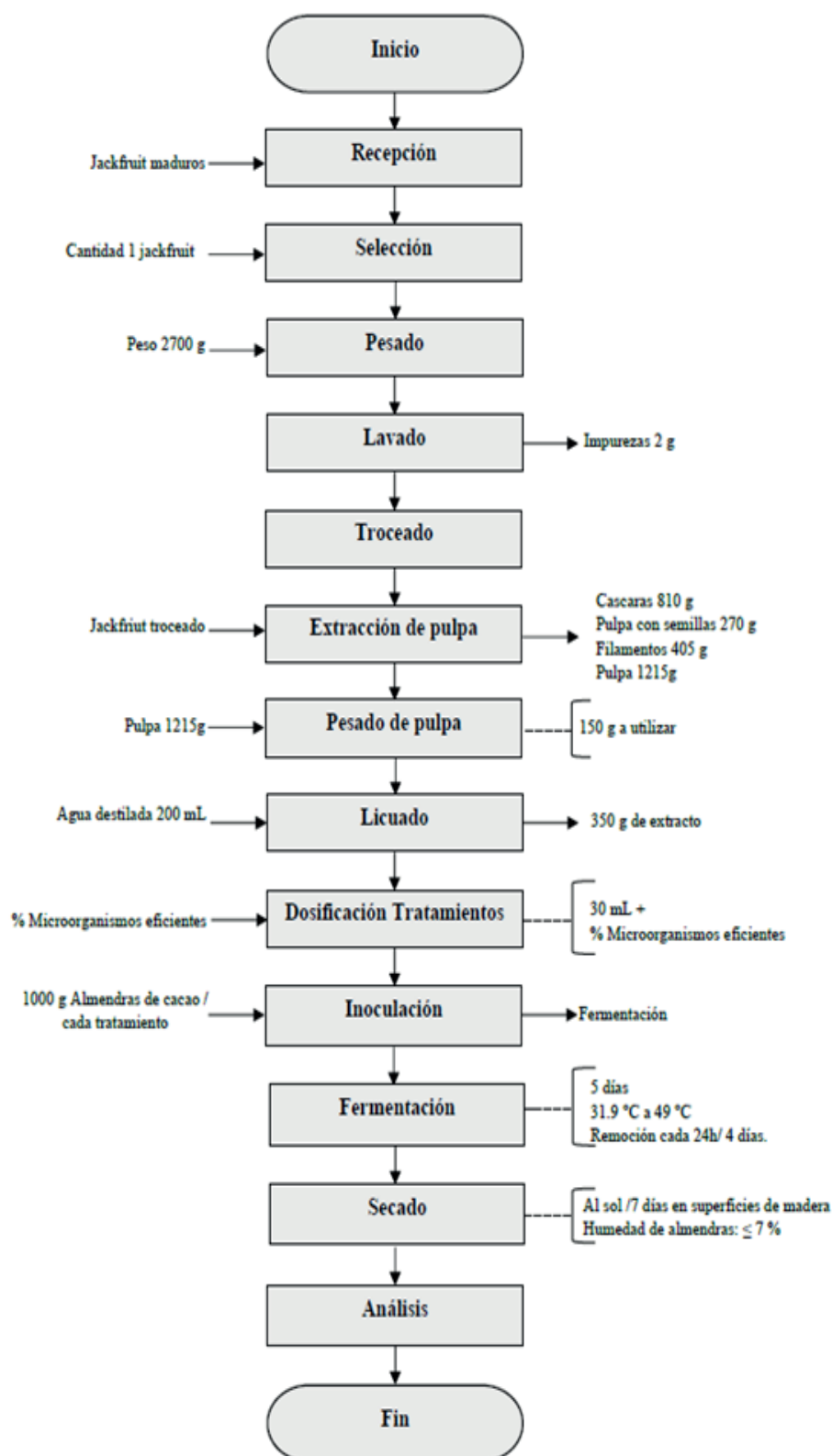


Figura 2. Diagrama del proceso de obtención y aplicación del extracto diluido de jackfruit en la fermentación y secado de cacao

Preparación de extracto diluido de frutas maracuyá

Paralelamente, se preparó un licuado a base de pulpa de maracuyá, como se observa en la figura 3, para lo cual se emplearon 400 g de fruta frescas (equivalente a aproximadamente 4 frutos de maracuyá, considerando un peso promedio de 100 g por fruta), de los cuales se procesaron 150 g de pulpa. La pulpa se mezcló con 200 mL de agua destilada, asegurando que el proceso se realizara bajo condiciones controladas para preservar la actividad enzimática y cumplir con los parámetros establecidos por la metodología propuesta por Peña⁽¹⁰⁾.

Secado de las almendras de cacao

Se procedió al secado de las almendras de cacao. Este se realizó bajo luz solar directa, asegurando un manejo cuidadoso para evitar la mezcla de los granos provenientes de diferentes tratamientos y fincas. El proceso de secado del cacao se llevó a cabo sobre superficies de madera especialmente acondicionadas para esta práctica, evitando el contacto con superficies no aptas que pudieran ocasionar contaminación por agentes externos.

Durante el secado, las almendras de cacao fueron removidas “Remociones” de manera adecuada y constante para garantizar una deshidratación homogénea. Este procedimiento se realizó por un periodo aproximado de 7 a 8 días, con el objetivo de alcanzar un contenido de humedad óptimo, comprendido entre 6 % y 7 %, asegurando la calidad final del producto.⁽¹⁾

Almacenamiento de las almendras de cacao

Una vez finalizada la etapa de secado, las almendras de cacao fueron almacenadas cuidadosamente, manteniendo la segregación según los tratamientos y repeticiones correspondientes. Para su conservación, se almacenaron en bolsas de papel, las cuales favorecen las ventilaciones y evitan la acumulación de humedad, contribuyendo al mantenimiento y mejora de la calidad de las almendras de cacao. Este método asegura que las características adquiridas durante el proceso de fermentación y secado se preserven de manera óptima hasta su análisis o posterior.⁽¹⁵⁾

Proceso de obtención de pasta de cacao al 100 %

Selección y clasificación: se clasificó la materia prima de cacao mediante una inspección visual-manual exhaustiva, eliminando cualquier contaminante o cuerpo extraño ajeno a las almendras. Este proceso garantiza la pureza de las almendras utilizadas.

Tostado: las almendras pasaron por un proceso de tostados con ayuda de una vasija de barro bajo condiciones controladas a una temperatura promedio de 120 °C. Este proceso se realizó durante un periodo de 18 a 25 minutos, asegurando una distribución uniforme de calor para evitar quemaduras y facilitar la eliminación de humedad residual.

Descascarillado: se llevó a cabo un proceso de descascarillado manual de las almendras, lo que permitió la separación de la testa de los cotiledones. Las almendras descascaradas fueron almacenadas en fundas de papel debidamente etiquetadas para evitar contaminación y preservar su integridad.

Molienda: se llevó a cabo la molienda de los cotiledones utilizando un molino manual tradicional. Este proceso permitió reducir el tamaño de las partículas, facilitando el posterior refinado y asegurando una textura uniforme en la pasta de cacao.

Refinado: el refinado se efectuó para alcanzar un tamaño de partícula menor a 40 micras, garantizando una textura homogénea y evitando la presencia de gránulos detectables por las papilas gustativas. Este paso es crítico para optimizar la calidad organoléptica del producto final.

Conchado: la masa de cacao refinada se procesó en una conchadora de capacidad de 5 kg. La muestra se introdujo de manera gradual para permitir que el equipo capture la totalidad de la materia prima adherida a sus paredes, logrando una distribución uniforme y una emulsificación eficiente. Este proceso se mantuvo por un periodo de 48 h para cada tratamiento, asegurando el desarrollo de un perfil sensorial superior.

Atemperado: una vez concluida el proceso de refinado, la pasta de cacao se sometió al proceso de atemperado, reduciendo de manera controlada su temperatura. Posteriormente, se vertió en moldes previamente higienizados, donde es importante el reposo hasta adquirir la consistencia deseada.

Envasado y almacenamiento: finalmente, la pasta de cacao se envolvió en papel aluminio para su almacenamiento. Cada unidad almacenó en fundas identificadas con códigos únicos para su trazabilidad y almacenada en condiciones de refrigeración a 4 °C, minimizando el riesgo de contaminación cruzada y preservando sus propiedades fisicoquímicas y organolépticas⁽¹⁵⁾, como se muestra en la figura 3.

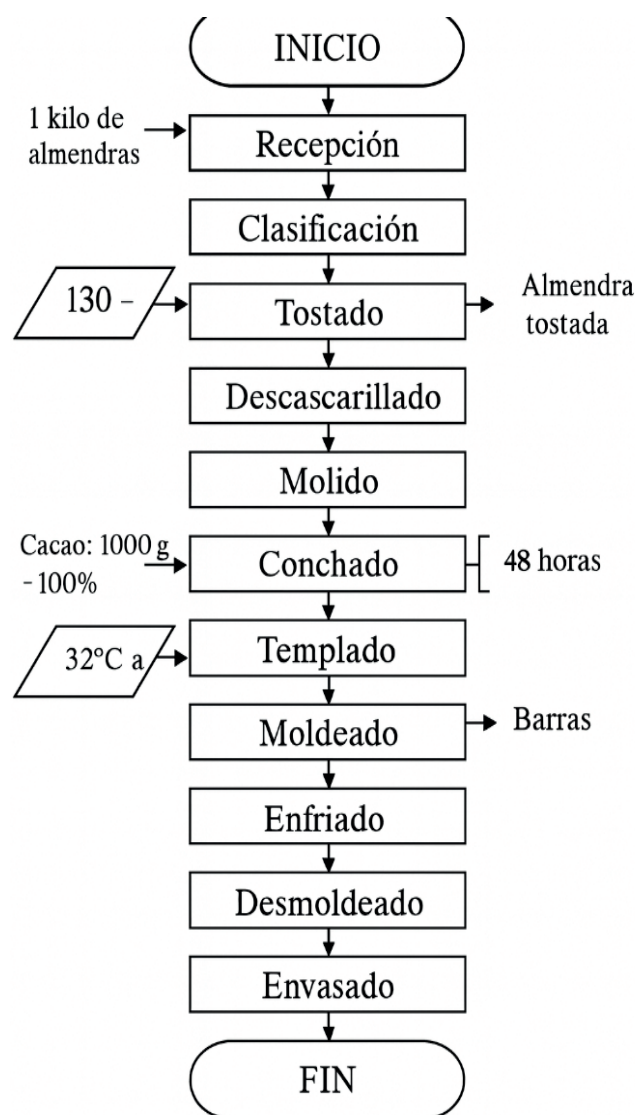


Figura 3. Diagrama del proceso de elaboración pasta de cacao

Análisis sensorial

Para el análisis sensorial se implementó un panel de cata semientrenados conformado por 50 catadores, los cuales determinaron: sabor, olor, textura, amargor, floral, almendra.⁽²⁰⁾

El análisis sensorial se realizó mediante una evaluación descriptiva estructurada del licor de cacao obtenido de los tratamientos experimentales. Para ello, se empleó una ficha sensorial con una escala hedónica ordinal de 1 a 5, en la que cada valor correspondió a una categoría previamente definida para cada atributo. Se evaluaron cinco parámetros principales: **color, aspecto, aroma, sabor y regusto**, cada uno con descriptores específicos.

La escala empleada para cada parámetro fue la siguiente:

- Color: 1 = café caramelo, 2 = marrón, 3 = nogal, 4 = algarrobo, 5 = café negro.
- Aspecto: 1 = muy brillante, 2 = brillante, 3 = satinado, 4 = opaco, 5 = muy opaco.
- Aroma: 1 = fruta tropical, 2 = cacao, 3 = frutal cítrico, 4 = tostado, 5 = nuez.
- Sabor: 1 = frutal, 2 = cacao tostado, 3 = afrutado seco, 4 = amargo, 5 = muy amargo.
- Regusto: 1 = persistencia suave, 2 = amargo, 3 = cítricos no prolongados, 4 = astringente, 5 = sensación manchosa.

Las muestras fueron identificadas mediante códigos (T1-T24) para garantizar una evaluación a ciegas y evitar sesgos perceptuales. La sesión se desarrolló en un ambiente con iluminación neutra, temperatura controlada (20 ± 2 °C) y sin interferencias visuales u olfativas. Cada muestra fue servida en recipientes codificados y evaluada de forma individual e independiente.

Los datos obtenidos fueron organizados para su análisis estadístico posterior conforme al diseño experimental establecido.

Pruebas físico químicas a la pasta de cacao

Determinación de pH y acidez en pasta de cacao

El análisis de pH se realizó en duplicado empleando la misma muestra previamente homogenizada. Antes de iniciar la determinación de esta variable. Acto seguido, el electrodo de vidrio fue enjuagado varias veces con agua destilada hasta lograr estabilizar la lectura a un pH 6; se procedió a colocar en una parte representativa de la muestra en un matraz volumétrico con capacidad entre 25 y 100 cm³, en el cual se sumergieron el electrodo. En primera instancia, se adicionaron entre 10 y 25 cm³ de solución de hidróxido de sodio (NaOH) 0,1 N, agitado constantemente hasta alcanzar un valor de pH 6. La neutralización se continuó con adición más lentas de la misma solución hasta llegar a pH 7. Luego se incorporó NaOH 0,1 N gota a gota, alrededor de cuatro gotas por cada adición, reportando de manera secuencial tanto el volumen total adicionando como el valor de pH resultante, hasta aproximarse a pH 8,3.

La determinación precisa del volumen de NaOH 0,1 N se llevó a cabo utilizando interpolación, lo que permitió identificar el punto de pH 8,1. A partir de este valor se calculó el porcentaje de acidez, empleando la ecuación designada como la formula consiguiente.⁽²¹⁾

Ecuación 3. Determinación del pH y la acidez en la pasta de cacao

$$\% \text{ Acidez} = (V1N1M) \cdot 10V2$$

Donde: V1= cm³ de NaOH usados para la titulación de la muestra

N1= Normalidad de la solución de NaOH

M= Peso molecular del ácido considerado como referencia

V2= Volumen de la muestra tomada para el análisis.

Determinación de humedad en la pasta de cacao

El análisis de humedad se determinó por duplicado, en primera instancia, los crisoles de porcelana destinadas a contener las muestras fueron acondicionados en la estufa alrededor de 30 minutos. Una vez retirados, se dejaron enfriar a temperaturas ambientes y se registró su peso con precisión analítica.

La muestra previamente homogenizada fue pesada en una cantidad aproximada de 2 g, con una exactitud de 0,1 mg. Posteriormente, los crisoles con las muestras se sometieron a secado en estufa, siendo a 130 °C durante dos horas, de acuerdo con el procedimiento establecido.

Después del secado, los crisoles se trasladaron a un desecador y se dejaron enfriar alrededor de 30 minutos para evitar la absorción de humedad ambiental, sin embargo en el mismo contexto, se procedió a realizar el pesaje final, y con los valores obtenidos se determinó el contenido de humedad de la muestra utilizando la ecuación.⁽²¹⁾

Ecuación 4. Determinación de humedad en la pasta de cacao.

$$\% H = \frac{M2 - M3}{M2 - M1} \times 100$$

Donde:

M1= Masa del recipiente vacío (g)

M2= Masa del recipiente más la muestra (g)

M3= Masa contante de la muestra seca (g)

Determinación de cenizas en la pasta de cacao

El análisis de cenizas se llevó a cabo en duplicado, luego los crisoles fueron sometidos a un proceso de limpieza y posteriormente acondicionados en una estufa a 100 °C durante 30 minutos, tras el secado, se dejaron reposar en un desecador hasta conseguir temperaturas ambientes, registrándose su peso con una precisión de 0,1 mg.

Sobre cada crisol previamente tarado se incorporaron aproximadamente 2 g de muestra homogénea, verificando la masa con la misma exactitud. A continuación, se precedió a la incineración en mufla a 600 ± 20 °C, manteniendo esta temperatura hasta alcanzar cenizas uniformes y libres de restos carbonosos, tras cerca de 3 h de combustión. Finalmente, los crisoles fueron retirados, enfriados nuevamente en desecador y pesados con una sensibilidad de 0,1 mg. A partir de las mediciones obtenidas, el contenido de ceniza se determinó aplicando la formula establecida.⁽²¹⁾

Ecuación 5. Determinación de cenizas

$$\text{Ceniza} = \frac{M3 - M1}{M2 - M1} \times 100$$

Donde:

M1: Masa de crisol vacío (g)

M2: Masa del crisol más la muestra (g)

M3: Masa crisol con las cenizas(g)

Determinación de proteína en la pasta de cacao

El contenido de proteína se determinó aplicando el método Kjeldahl, procedimiento que cuantifica el nitrógeno total presente en la muestra. Las técnicas consiste en digerir la muestra con ácido sulfúrico en presencia de un catalizador, comúnmente mercurio o selenio, siguiendo la metodología básica realizada en la investigación de Vera.⁽²²⁾

Preparación de la muestra:

Moler aproximadamente 100 g, de muestra en un micro molino que contenga un tamiz con abertura de 1 mm, garantizando que el 95 % del material obtenido logrará atravesar dicha malla.

Las muestras previamente molida y homogenizada fueron trasladados de manera inmediata a un recipiente de cierre hermético, donde se mantuvo hasta el momento de análisis.

La muestra se fue homogenizada agitando en repetidas ocasiones el recipiente que lo contenía, asegurando una distribución uniforme.

Procedimiento digestión:

Posteriormente se procedió a pesar alrededor de 0,3 g de la muestra previamente acondicionada sobre un papel libre de nitrógeno, y colocado en el micro tubo digestor.

Se incorporó una tabla catalizadora junto con 5 ml de ácido sulfúrico concentrado al interior del micro tubo digestor.

Los tubos de digestión, conteniendo las respectivas muestras, se introdujeron en el block-digest. Se aseguró que el colector de humos estuviera en funcionamiento para la correcta operación del equipo.

Se procedió a encender el digestor y de forma oportuna, se colocaron los tapones correspondientes para asegurar el correcto desarrollo del proceso.

El digestor se encendió y se calibró a 350 a 400 °C y la muestra se mantuvo en el equipo hasta que logró alcanzar su clarificación, evidenciada por un color verde claro.

Se permitió el enfriamiento de la muestra hasta alcanzar la temperatura ambiente.

Se minimizó el riesgo de precipitación a través de una agitación ocasional.

Destilador:

En cada micro tubo se adicionó 15 mL de agua destilada.

En el sistema de destilación Kjeltex, se insertaron el microtubo y el matraz de recepción, el cual contenía 50 mL de una solución de ácido bórico al 2 %.

El sistema fue activado y posteriormente, se incorporaron 30 mL de hidróxido de sodio al 40 %, asegurando en todo momento la correcta circulación de flujo de agua, condición indispensable para garantizar la estabilidad del proceso y la confiabilidad de los resultados analíticos encontrados.

Se recolectaron aproximadamente 200 mL del destilado obtenido y, una vez finalizado el proceso, se retiraron cuidadosamente los accesorios del sistema y se procedió a apagar el equipo.

Titulación:

Al destilado previamente recolectado en el matraz, se adicionaron tres gotas del indicador correspondiente para continuar con el procedimiento analítico.

La muestra fue titulada empleando ácido clorhídrico 0,1 N, utilizando un agitador mecánico para asegurar una mezcla homogénea durante el proceso de valoración. Se registró el volumen de ácido consumido.

Cálculos

La cuantificación de las proteínas brutas en los alimentos se calculó aplicando la fórmula que se presenta a continuación.

Ecuación 6. Determinación de proteína

$$PB = \frac{(VCHI - Vb) * 1.401 * NHCl * F}{g. muestra}$$

Donde:

1,401= Peso atómico del nitrógeno.

NHCl= Normalidad de ácido clorhídrico 0,1 N.

F= Factor de conversión (6,25).

VHCl= Volumen del ácido clorhídrico consumido en la titulación.

Vb= Volumen del Blanco (0,1).

Determinación de energía en la pasta de cacao

La variable de energía se determinó mediante el uso de una bomba calorimétrica, técnica que hace posible cuantificar el calor de combustión de las muestras. Este método se basa en la medición del incremento de temperatura generado durante la combustión completa de la pastilla de muestra en un ambiente rico en oxígeno.

Preparación de la muestra

Se elaboró una pastilla compacta de la muestra utilizando una prensa, tomando entre 1,0 y 1,5 g, que luego fue pesada en una balanza analítica con sensibilidad de 0,1 mg.

Procedimiento de combustión

La muestra se introdujo en la bomba de ignición, sellado el sistema y presurizándolo con oxígeno a 30 atmósferas. En la cubeta del calorímetro se colocan 2000 mL de agua destilada o desmineralizada, asegurando que la temperatura inicial se mantuviera por debajo de la temperatura ambiente donde se esté realizando la investigación (laboratorio).

La bomba de ignición fue instalada en la cubeta, conectando los electrodos de conducción de corriente eléctrica, posterior, se procedió a colocar la tapa del calorímetro y se acopló el brazo agitador, el cual permaneció en funcionamiento durante 3 min para estabilizar la temperatura del agua.

Registro de la temperatura:

Se registró la temperatura inicial y se accionó el encendido eléctrico de la bomba, iniciando la combustión de la muestra. Durante el proceso, la temperatura fue monitoreada cada minuto hasta lograr alcanzar un punto de estabilización.

Finalmente, se anotó la temperatura máxima alcanzada, se retiró la correa y la cubierta del calorímetro, y la bomba fue colocada en el soporte estándar para su enfriamiento.

Procedimiento posterior a la combustión

Se abrió lentamente la válvula superior de la bomba para liberar los gases residuales. Una vez eliminada la presión interna, se retiró la tapa y se examinó el interior de la bomba, enjuagando los residuos con aguas destilada. Esta solución de enjuague se transfirió a un matraz Erlenmeyer.

Luego se añadieron 1 mL de solución de fenolftaleína al 2 % y se valoró la solución con carbonato de sodio 0,1 N, con el fin de cuantificar los ácidos generados durante la ignición, principalmente ácido nítrico y sulfúrico.

Cálculos*Ecuación 7. Determinación de energía*

$$g = \frac{Tw - e1 - e2 - e3}{m}$$

Donde:

Hg= representa el poder calórico, expresado en calorías por gramo (Cal/g).

T= Temperatura final - Temperatura inicial.

W= es la energía equivalente del calorímetro, con un valor de 2410,16.

e1= representa los mililitros consumidos de la solución de carbonato de sodio.

e2= (13,7 X 1,02) peso de la muestra.

e3= cm. Del alambre x 2,3.

m= Peso de la muestra.

RESULTADOS

Variables químicas de la pasta de cacao

El análisis de varianza mostró respuestas contrastantes de las variables fisicoquímicas frente a los factores evaluados (variedad, concentración de microorganismos eficientes y tipo de extracto frutal), así como sus interacciones. En la variable pH se observaron diferencias altamente significativas para el factor EM% ($p = 0,0004$) y para la interacción EM%×Extractos% ($p = 0,0055$), lo que evidencia que la acidificación del grano depende de la carga microbiana y del sustrato frutal utilizado. La variedad no mostró efectos relevantes ($p > 0,05$), lo que indica un comportamiento similar entre CCN-51 y Nacional frente a los tratamientos. La acidez titulable presentó significancia para EM% ($p < 0,0001$), Extractos% ($p = 0,0078$) y la interacción EM%×Extractos% ($p = 0,0024$).

Además, la interacción tridireccional Variedad×EM%×Extractos% fue significativa ($p = 0,0276$), lo que sugiere que la producción de ácidos orgánicos está modulada tanto por el genotipo como por los compuestos bioactivos presentes en los extractos y la microbiota inoculada. En la humedad se registraron efectos significativos para EM% ($p = 0,0001$) y para la interacción EM%×Extractos% ($p = 0,0038$), junto con significancia en Variedad×Extractos% ($p = 0,0214$), lo que evidencia una influencia combinada sobre la retención y pérdida de agua durante la fermentación.

En el contenido de ceniza no se detectaron diferencias para los factores principales; sin embargo, la interacción EM%×Extractos% mostró significancia ($p < 0,05$), lo que indica una ligera alteración en la composición mineral asociada a la degradación del mucílago y la acción microbiana. Para la proteína, el único efecto significativo correspondió a la variedad ($p = 0,0001$), siendo la concentración proteica dependiente del genotipo más que del tratamiento fermentativo. En el contenido energético (kcal/g), la variedad fue significativa ($p = 0,038$), mientras que EM% presentó una tendencia ($p = 0,1121$), sin influencia atribuible a los extractos o interacciones.

En términos generales, las variables pH, acidez, humedad y ceniza fueron las más sensibles a la acción combinada de los factores fermentativos, mientras que la proteína y la energía estuvieron determinadas principalmente por la base genética del material. La presencia de interacciones de segundo y tercer orden respalda la naturaleza multifactorial del proceso fermentativo del cacao. Los coeficientes de variación (4-25 %) y los valores del error estándar medio confirmaron la precisión experimental y la confiabilidad de los datos obtenidos.

En la tabla 4 se observan las variables químicas del licor de cacao.

Tabla 4. Efecto de la interacción microorganismos eficientes por la aplicación de extractos diluidos de frutas sobre las variables químicas de la pasta de cacao

Factores			Variable					
Variedad	EM%	Extractos%	pH	Acidez	%Humedad	%Ceniza	% Proteína	Energía kcal/g
CCN-51	0	Sin extracto	5,88	0,87	4,07	3,02	8,55	10,35
CCN-51	0	Banana	6,54	0,58	3,46	2,97	9,05	9,28
CCN-51	0	Jackfruit	6,46	0,60	3,47	3,05	9,71	9,05
CCN-51	0	Maracuya	6,40	0,61	3,39	3,73	10,3	8,51
CCN-51	40	Sin extracto	5,89	0,86	4,07	3,01	9,03	6,90
CCN-51	40	Banana	6,54	0,59	3,44	2,98	10,58	6,75
CCN-51	40	Jackfruit	6,48	0,62	3,44	3,04	10,5	5,90
CCN-51	40	Maracuya	6,40	0,58	3,38	3,77	11,19	6,44
CCN-51	80	Sin extracto	5,89	0,87	4,07	3,01	11,47	6,82
CCN-51	80	Banana	6,54	0,59	3,45	2,98	10,69	5,98
CCN-51	80	Jackfruit	6,47	0,61	3,46	3,04	11,95	5,67
CCN-51	80	Maracuya	6,40	0,60	3,39	3,75	12,91	5,37
Nacional	0	Sin extracto	6,16	0,75	3,75	3,03	8,37	7,08
Nacional	0	Banana	6,17	0,74	3,74	3,03	8,64	7,09
Nacional	0	Jackfruit	6,16	0,74	3,75	3,03	8,55	7,02
Nacional	0	Maracuya	6,49	0,57	3,34	3,06	8,20	6,61
Nacional	40	Sin extracto	6,49	0,58	3,35	3,05	9,40	6,14
Nacional	40	Banana	6,48	0,58	3,35	3,05	9,07	6,61

Nacional	40	Jackfruit	6,27	0,65	3,34	3,15	9,07	6,20						
Nacional	40	Maracuya	6,28	0,65	3,35	3,15	10,00	5,80						
Nacional	80	Sin extracto	6,30	0,64	3,34	3,15	9,23	6,14						
Nacional	80	Banana	6,53	0,55	3,69	3,41	9,75	5,94						
Nacional	80	Jackfruit	6,51	0,54	3,71	3,40	10,52	6,07						
Nacional	80	Maracuya	6,52	0,56	3,73	3,43	10,00	5,87						
		DMS	0,86091	0,38125	105,061	0,93015	381,649	544,568						
		EEM ±	0,16	0,07	0,19	0,17	0,70	0,70						
		CV	4,31	18,67	9,36	9,30	12,29	25,39						
		Variedad	0,5578	ns	0,2263	ns	0,5396	ns	0,6121	ns	0,0001	**	0,0380	*
		EM%	0,0004	*	<0,0001	**	0,0001	**	<0,0001	**	0,0003	*	0,1121	ns
		Extractos%	0,0388	*	0,0078	*	0,4033	ns	0,0564	ns	0,6772	ns	0,8482	ns
		Variedad*EM%	0,1547	ns	0,2908	ns	0,0304	*	0,0827	ns	0,9612	ns	0,9908	ns
		Variedad* Extractos%	0,4704	ns	0,2170	ns	0,0214	*	0,3320	ns	0,9999	ns	>0,9999	ns
		EM%* Extractos%	0,0055	*	0,0024	*	0,0038	*	0,1192	ns	0,4679	ns	0,9986	ns
		Variedad*EM% *Extractos	0,0354	*	0,0276	*	0,1206	ns	0,3334	ns	>0,9999	ns	>0,9999	ns

Variables Sensoriales

Perfil sensorial color

El análisis del perfil sensorial del parámetro color evidenció diferencias marcadas entre los tratamientos correspondientes a las variedades CCN-51 (T1-T12) y Nacional (T13-T24). La escala utilizada (1 = café caramelo, 2 = marrón, 3 = nogal, 4 = algarrobo, 5 = café negro) permitió identificar la intensidad cromática asociada a cada unidad experimental.

En los tratamientos T1 a T12 (CCN-51), se observaron valores predominantemente comprendidos entre 3 y 5, lo que indica tonalidades que van desde nogal hasta café negro, con una ligera variación entre tratamientos con y sin extractos frutales o microorganismos eficientes. Los tratamientos T3, T4 y T5 mostraron las puntuaciones más altas dentro de la variedad, lo que sugiere una coloración más oscura atribuible a un proceso fermentativo más uniforme o a la interacción positiva entre los extractos y la microbiota aplicada. En contraste, los tratamientos T7, T8, T9 y T10 presentaron valores ligeramente inferiores, lo que indica variaciones en la pigmentación posiblemente asociadas a diferencias en la degradación de polifenoles o a la actividad microbiana diferenciada.

En los tratamientos T13 a T24 (variedad Nacional), los valores oscilaron principalmente entre 2 y 4, mostrando una menor intensidad cromática respecto a CCN-51. Los tratamientos T18, T19, T20 y T21 registraron niveles medios-altos (≈ 4), sugiriendo una mayor expresión de tonalidades algarrobo en presencia de extractos frutales como maracuyá y jackfruit. No obstante, tratamientos como T14, T15 y T16 reflejaron valores más bajos dentro de esta variedad, indicando tonos cercanos a marrón o nogal. Esta respuesta diferencial puede estar influenciada por la composición polifenólica propia del genotipo Nacional, cuya respuesta a los consorcios microbianos parece menos intensa en comparación con CCN-51.

En términos comparativos, CCN-51 mostró una mayor homogeneidad y valores más elevados en la escala de color, lo cual puede atribuirse a una mayor actividad oxidativa de compuestos fenólicos y a una fermentación más consistente. Por el contrario, en la variedad Nacional se evidenció mayor dispersión entre tratamientos, lo que sugiere una interacción más dependiente del tipo de extracto frutal y la concentración de microorganismos eficientes.

Estos hallazgos indican que tanto el material genético como los factores tecnológicos aplicados (EM% y extractos) influyen directamente sobre la expresión cromática del licor de cacao, con implicaciones directas en la aceptación sensorial del producto final y su potencial de estandarización industrial; como se observa en la figura 4 de la nota sensorial de color.

Perfil sensorial de COLOR

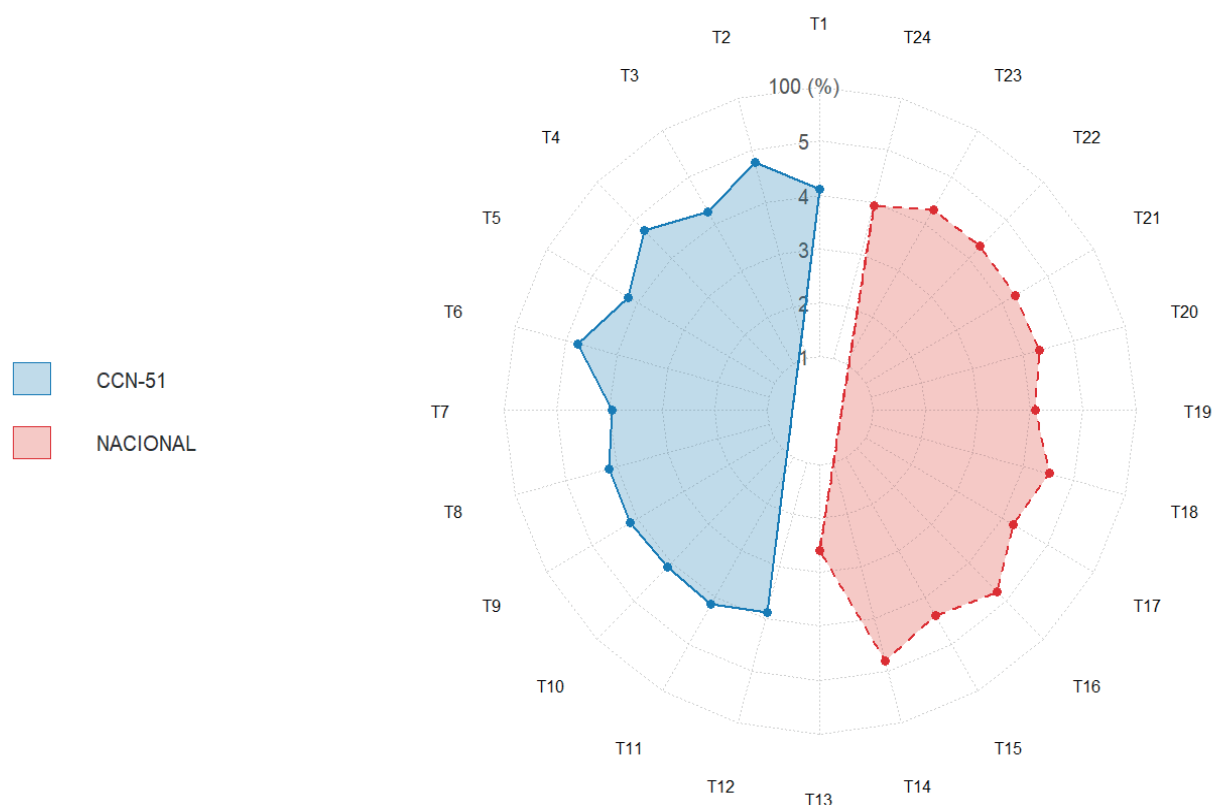


Figura 4. Efecto de la interacción microorganismos eficientes con aplicación de extractos diluidos de frutas, sobre el perfil sensorial de color de la pasta de cacao CCN-51 y Nacional

Perfil sensorial aspecto

El análisis del parámetro aspecto reveló diferencias consistentes entre los tratamientos T1-T12 (variedad CCN-51) y T13-T24 (variedad Nacional), utilizando la escala sensorial:

1 = muy brillante, 2 = brillante, 3 = satinado, 4 = opaco y 5 = muy opaco. En los tratamientos correspondientes a CCN-51 (T1-T12) se observaron puntuaciones predominantemente entre 2 y 4, lo que indica superficies con acabado brillante a satinado, con leves tendencias hacia la opacidad en determinados tratamientos. Los valores más bajos (T8, T9, T10 y T11) reflejan un aspecto más limpio y uniforme, posiblemente asociado a una mejor degradación del mucílago y mayor actividad microbiana durante la fermentación. Por otro lado, tratamientos como T1, T2 y T4 mostraron valores cercanos a 4, lo que sugiere un aspecto ligeramente más opaco, posiblemente influenciado por la interacción entre los extractos frutales y la carga microbiana aplicada.

En la variedad Nacional (T13-T24) se evidenció una tendencia a puntuaciones más elevadas, con valores entre 3 y 5, indicando superficies predominantemente satinadas a muy opacas. Los tratamientos T18, T19, T20 y T21 presentaron los valores más altos, asociados a un aspecto menos brillante, lo que puede deberse a una menor eficiencia en la desintegración del mucílago o a diferencias varietales en la composición fenólica y lipídica del grano. En contraste, T13, T14 y T15 mostraron valores ligeramente inferiores dentro de la variedad, revelando una respuesta más moderada frente a los extractos frutales.

La comparación directa entre ambas variedades demuestra que CCN-51 presenta una apariencia más uniforme y con menores niveles de opacidad que Nacional, lo que puede relacionarse con una fermentación más homogénea y mayor facilidad de ruptura del mucílago. En cambio, la variedad Nacional mostró mayor dispersión entre tratamientos, lo cual sugiere que el aspecto visual del licor depende en mayor medida del tipo de extracto y del nivel de microorganismos eficientes. En conjunto, los resultados indican que el aspecto del licor de cacao responde tanto al genotipo como al manejo fermentativo, siendo más favorable en CCN-51, donde predominan superficies satinadas y brillantes. Estos hallazgos tienen implicaciones directas en la percepción visual del producto final y en su aceptabilidad para aplicaciones industriales y sensoriales de alto valor agregado; como se visualiza en la figura 5 de la nota sensorial de aspecto.

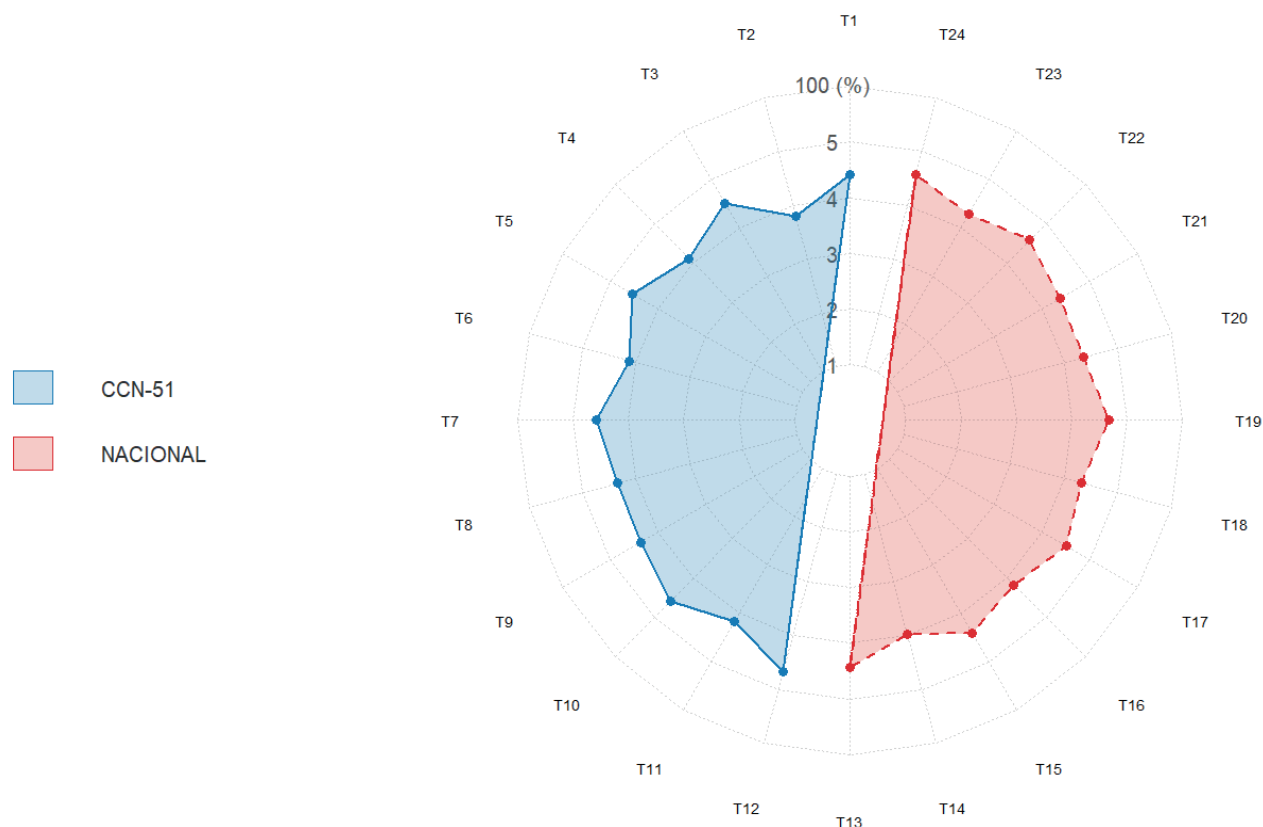


Figura 5. Efecto de la interacción microorganismos eficientes con la aplicación de extractos diluidos de frutas, sobre el perfil sensorial del aspecto de la pasta de cacao CCN-51 y Nacional

Perfil sensorial aroma

El análisis del parámetro aroma mostró diferencias definidas entre las variedades CCN-51 (T1-T12) y Nacional (T13-T24), de acuerdo con la escala sensorial empleada (1 = fruta tropical, 2 = cacao, 3 = frutal cítrico, 4 = tostado y 5 = nuez). Los resultados evidenciaron valores dominantes intermedios (3-4) en ambas variedades, sin alcanzar los extremos de la escala, lo que indica intensidades aromáticas moderadas pero consistentes entre tratamientos.

En los tratamientos T1 a T12 (variedad CCN-51) se observaron puntuaciones comprendidas entre 3 y 4, con predominio de notas frutales-cítricas y de cacao, típicas de fermentaciones equilibradas y frescas. Los tratamientos T3, T4 y T5 presentaron las puntuaciones más altas dentro de la variedad, asociadas a una fermentación más activa y a la acción combinada de los microorganismos eficientes (EM) y los extractos frutales, especialmente de maracuyá y banana, que favorecen la formación de ésteres y alcoholes aromáticos responsables de notas frutales y tostadas suaves. En contraste, los tratamientos T8 a T11 registraron puntuaciones más bajas, vinculadas a un menor desarrollo de compuestos volátiles o a una oxidación parcial de precursores aromáticos.

En los tratamientos T13 a T24 (variedad Nacional), las puntuaciones se situaron entre 3 y 4, reflejando una mayor complejidad aromática, con predominio de notas tostadas y ligeras percepciones a nuez. Los tratamientos T18, T19 y T20 alcanzaron las puntuaciones más elevadas dentro del grupo, lo que sugiere una fermentación más profunda y una transformación acentuada de compuestos fenólicos y lipídicos característicos de este genotipo. Por su parte, T14 y T15 mostraron valores intermedios (≈ 3), en los que coexisten matices de cacao y frutal cítrico, evidenciando una transición aromática moderada.

En términos comparativos, CCN-51 expresó un perfil aromático más fresco, cítrico y afrutado, mientras que Nacional manifestó una mayor intensidad tostada, con tendencia hacia matices a nuez. Estas diferencias reflejan la influencia conjunta del genotipo y de los factores biotecnológicos aplicados (EM y extractos frutales) sobre la dinámica fermentativa y la conversión de alcoholes y aldehídos en compuestos aromáticos secundarios. Los resultados confirman que la co-aplicación de microorganismos eficientes y extractos frutales modula significativamente la expresión aromática del licor de cacao, generando perfiles diferenciados según la variedad, como se observa en la figura 6 de la nota sensorial de aroma.

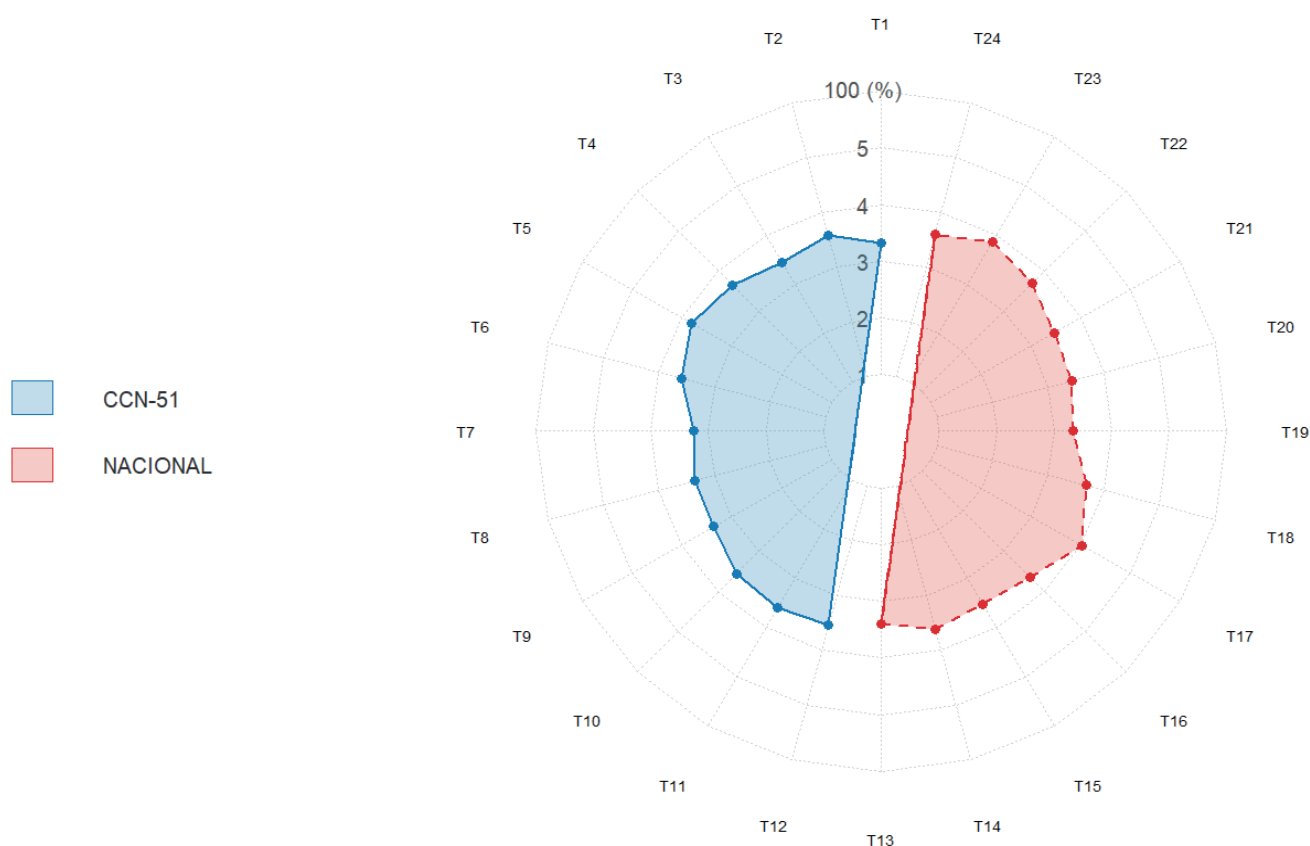


Figura 6. Efecto de la interacción microorganismos eficientes con la aplicación de extractos diluidos de frutas, sobre el perfil sensorial de aroma de la pasta de cacao CCN-51 y Nacional

Perfil sensorial sabor

El análisis del parámetro sabor evidenció diferencias definidas entre las variedades CCN-51 (T1-T12) y Nacional (T13-T24), conforme a la escala sensorial (1 = frutal, 2 = cacao tostado, 3 = afrutado seco, 4 = amargo, 5 = muy amargo). Los resultados mostraron valores dominantes altos, cercanos a 4, sin alcanzar el valor máximo de la escala, lo que refleja una intensidad gustativa pronunciada y estable, influenciada por la interacción entre el porcentaje de microorganismos eficientes (EM) y la aplicación de extractos frutales diluidos durante la fermentación.

En los tratamientos T1 a T12 (variedad CCN-51), las puntuaciones se concentraron en torno a 4, con predominio de notas amargas y de cacao tostado. Los tratamientos con mayor nivel de EM (80 %), especialmente cuando se combinaron con extractos de maracuyá y banana (T11-T12), manifestaron una mayor percepción de amargor, asociada a una fermentación más intensa y a una transformación eficiente de polifenoles y alcaloides en compuestos amargos y tostados. En cambio, los tratamientos con ausencia de EM (T1-T4) presentaron un perfil algo más equilibrado, con predominio de notas afrutadas secas. Los tratamientos intermedios (40 % EM) mantuvieron un sabor amargo moderado, evidenciando el efecto progresivo del incremento microbiano en la expresión gustativa. En la variedad Nacional (T13 a T24), las puntuaciones se mantuvieron igualmente cercanas a 4, aunque con una mayor homogeneidad y redondez del perfil. Los tratamientos con 80 % EM y extractos de maracuyá o jackfruit (T23-T24) presentaron los valores más altos dentro del grupo, mostrando amargor suave con matices tostados. Por su parte, los tratamientos sin EM o con extractos neutros (T13-T16) conservaron un carácter menos amargo y más afrutado, vinculado a una fermentación natural más lenta y menor degradación de compuestos fenólicos. La comparación entre variedades revela que CCN-51 desarrolló un sabor más intenso y persistente, mientras que Nacional exhibió un perfil más equilibrado y redondo, con menor astringencia. Estas diferencias confirman la influencia del genotipo y de los factores biotecnológicos aplicados (EM% × tipo de extracto frutal) sobre la formación de compuestos gustativos clave, como alcaloides, ácidos orgánicos y fenoles oxidados, determinantes del sabor final del licor de cacao.

En conjunto, los resultados demuestran que la co-aplicación de microorganismos eficientes y extractos frutales diluidos constituye una estrategia biotecnológica eficaz para modular la intensidad y equilibrio del sabor, generando perfiles diferenciados según la variedad y el tratamiento, como se observa en la figura 7 del perfil sensorial de sabor.

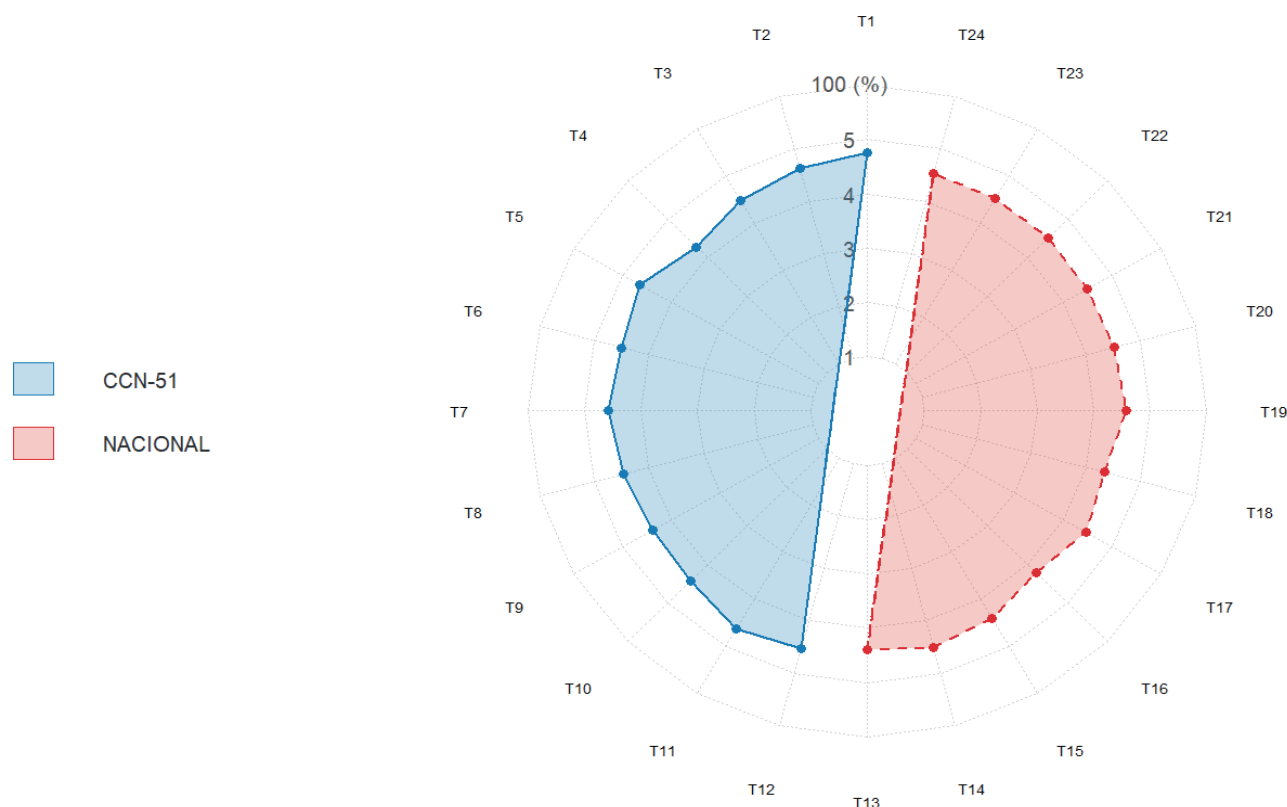


Figura 7. Efecto de la interacción microorganismos eficientes con la aplicación de extractos diluidos de frutas, sobre el perfil sensorial de sabor de la pasta de cacao CCN-51 y Nacional

Perfil sensorial regusto

El análisis del parámetro regusto mostró diferencias definidas entre las variedades CCN-51 (T1-T12) y Nacional (T13-T24), de acuerdo con la escala sensorial (1 = persistencia suave, 2 = amargo, 3 = cítricos no prolongados, 4 = astringente, 5 = sensación manchosa). Los resultados evidenciaron valores predominantes cercanos a 3, sin alcanzar niveles de astringencia, lo que refleja una persistencia gustativa moderada, con predominio de notas cítricas suaves y amargas ligeras, moduladas por la interacción entre el porcentaje de microorganismos eficientes (EM) y la aplicación de extractos frutales diluidos durante la fermentación.

En los tratamientos T1 a T12 (variedad CCN-51), las puntuaciones se concentraron alrededor de 3, caracterizando regustos equilibrados y estables. Los tratamientos con mayor concentración de EM (80 %) y extractos de maracuyá o banana (T11 y T12) presentaron una persistencia ligeramente más prolongada, atribuida a la sinergia entre los microorganismos eficientes y los compuestos bioactivos de los extractos frutales, que favorecieron una modulación más equilibrada de los metabolitos del sabor y aportaron mayor equilibrio gustativo al perfil final. Por su parte, los tratamientos sin EM o sin extractos frutales (T1-T4) mantuvieron valores similares, aunque con una menor complejidad sensorial, expresando un regusto estable, pero con menor diversidad aromática, sin pérdida de intensidad.

En la variedad Nacional (T13-T24), las puntuaciones se situaron igualmente cerca de 3, revelando una persistencia media con matices frutales sutiles. Los tratamientos con 80 % de EM y extractos de jackfruit o maracuyá (T23 y T24) destacaron por una percepción más uniforme y equilibrada, mientras que aquellos con baja proporción de EM (0 % y 40 %) mostraron perfiles más simples, con una persistencia gustativa corta pero agradable. En general, la variedad Nacional presentó un regusto más suave y redondeado, en contraste con CCN-51, que evidenció una ligera tendencia hacia notas amargas persistentes, aunque sin alcanzar niveles de astringencia.

Estas diferencias responden al efecto conjunto del genotipo y de los factores biotecnológicos aplicados (EM × tipo de extracto frutal), los cuales modulan la oxidación de polifenoles, la formación de ácidos orgánicos y la retención de compuestos volátiles, determinantes en la sensación de persistencia final del licor de cacao.

En conjunto, los resultados confirman que la co-aplicación de microorganismos eficientes y extractos frutales diluidos constituye una estrategia biotecnológica eficaz para equilibrar el regusto, reduciendo las sensaciones amargas excesivas y promoviendo perfiles sensoriales más armónicos, como se observa en la figura 8 del perfil sensorial de regusto.

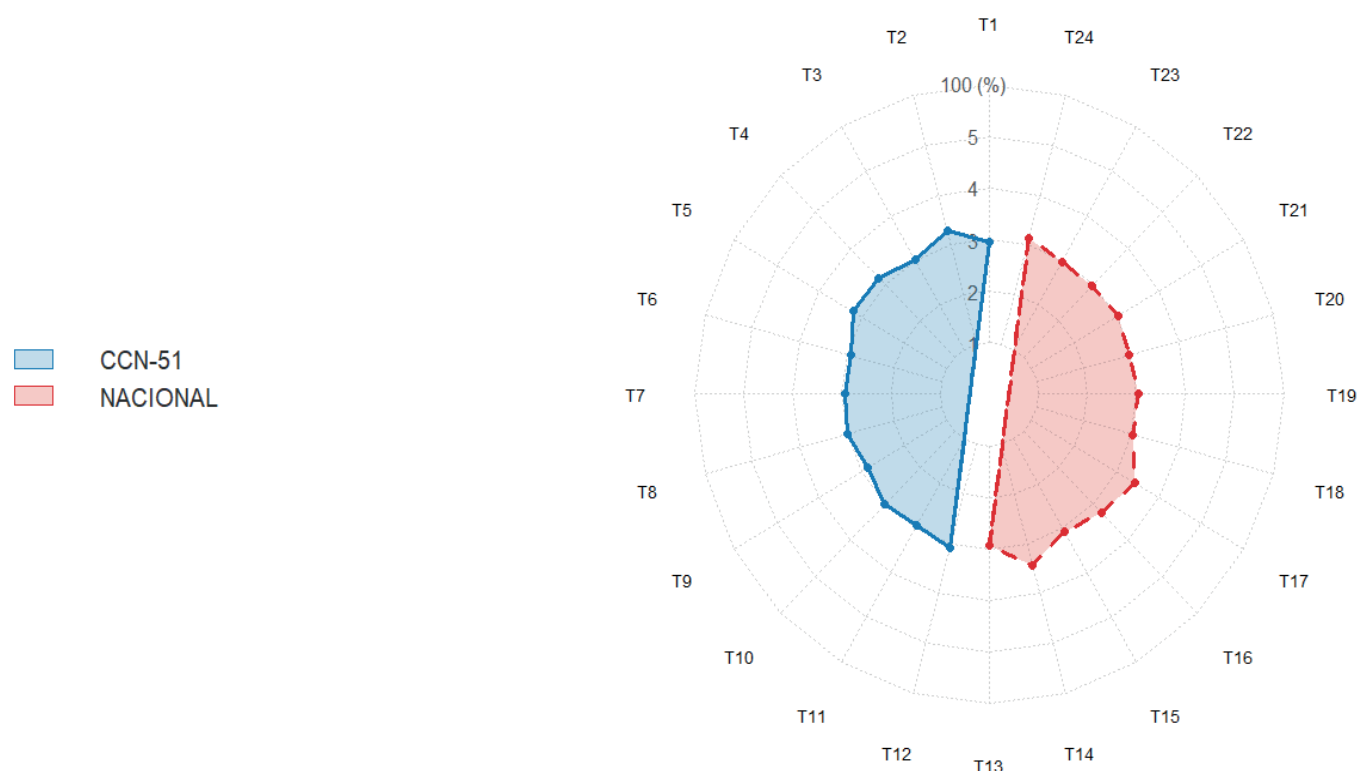


Figura 8. Efecto de la interacción microorganismos eficientes con la aplicación de extractos diluidos de frutas, sobre el perfil sensorial del regusto de la pasta de cacao CCN-51 y Nacional

DISCUSIÓN

Los resultados fisicoquímicos obtenidos confirman que la fermentación del cacao responde de manera diferencial a la interacción entre la microbiota inoculada, los extractos frutales y el material genético. La disminución significativa del pH asociada al incremento del EM% y a su combinación con los extractos evidencia una intensificación de las rutas ácido-lácticas y acético-oxidativas. Este comportamiento coincide con lo reportado por Díaz⁽²³⁾, quienes demostraron que los cultivos iniciadores y consorcios microbianos seleccionados pueden dirigir la dinámica ácida y la formación de compuestos precursores durante la fermentación de cacao, modificando así su acidez y perfil sensorial. De forma complementaria, Peña⁽¹⁰⁾ observó que la adición de matrices frutales ricas en azúcares fermentables modifica la disponibilidad de sustratos energéticos y regula la síntesis de ácidos orgánicos, lo cual sustenta el papel modulador de los extractos frutales en la actividad metabólica microbiana evidenciada en este estudio.

Adicionalmente, Voorde⁽²⁴⁾ demostraron que la selección de cepas de levaduras nativas empleadas como cultivos iniciadores en fermentaciones controladas de cacao influye significativamente en la conversión de azúcares y en la formación de ácidos orgánicos y compuestos volátiles responsables del desarrollo aromático. En su estudio, dichos autores reportaron que las cepas de *Saccharomyces cerevisiae* y *Hanseniaspora opuntiae* promovieron una fermentación más homogénea y con mayor complejidad aromática, asociada a un incremento en ésteres frutales y alcoholes superiores. Estos hallazgos respaldan la relevancia del control microbiano aplicado en el presente trabajo, al confirmar que la gestión de comunidades fermentativas permite dirigir la dinámica metabólica y potenciar la calidad sensorial del licor de cacao.

La acidez titulable mostró una respuesta clara a la interacción entre factores, reforzando la hipótesis de que los extractos aportan compuestos fermentables que favorecen la acción de levaduras y bacterias lácticas. Estudios de campo y laboratorio han reportado incrementos de acidez y cambios en el perfil de ácidos orgánicos cuando se emplean sustratos complementarios o inoculaciones dirigidas.⁽²⁵⁾ Además, trabajos recientes enfatizan que la respuesta acidogénica es modulada por la interacción genotipo×microbiota, lo que explica la significancia tridireccional Variedad×EM%×Extractos encontrada en nuestros datos.⁽²⁶⁾

En la variable humedad, la influencia del EM% y su interacción con los extractos confirma que la degradación del mucílago depende tanto de la microbiota aplicada como de los compuestos pectinolíticos presentes en frutas como banano y maracuyá. Chagas⁽²⁷⁾ describieron cómo matrices frutales ricas en pectinas y enzimas relacionadas que facilitan la ruptura de la matriz péptica, acelerando la licuefacción del mucílago y la pérdida de agua un mecanismo coherente con los tratamientos que mostraron mayor descenso de humedad en este estudio. En este contexto Rahayu⁽²⁸⁾ demostraron que la inoculación conjunta de levaduras y bacterias ácido-

lácticas (*Saccharomyces Cerevisiae*, *Lactiplantibacillus platarum* y *Acetobacter pasteurianus*) promueven una hidrólisis más rápida del mucílago y mejora la liberación de metabolitos secundarios durante la fermentación de cacao. Los autores observaron que la cooperación metabólica entre las levaduras y las bacterias lácticas acelera la degradación de las pectinas y aumenta la disponibilidad de ácidos orgánicos, alcoholes y azúcares reductores, favoreciendo un proceso fermentativo más homogéneo y eficiente. Este comportamiento coincide con los resultados del presente estudio, donde la combinación de microorganismos eficientes (EM %) y extractos frutales ricos en compuestos pectinolíticos (banano y maracuyá) facilitaron la licuefacción del mucílago y la pérdida de humedad. La acción sinérgica de estas biotas contribuyen a una transferencia más rápida de metabolitos hacia el grano, lo cual influye directamente en la generación de precursores aromáticos y en la uniformidad del color y sabor del licor de cacao.

De manera complementaria, Morales⁽²⁹⁾ demostraron que la incorporación de la enzima Pectin Trans-Eliminase (PTE) durante la fermentación de los genotipos Nacional y CCN-51 contribuyó a mantener un balance adecuado entre acidez y notas características a cacao y nuez.

Los autores atribuyen este efecto a la modificación de la matriz péctica, mediante la ruptura de enlaces α -(1 $\rightarrow$ 4)-galacturónicos, lo que favorece una mayor permeabilidad del mucílago y la liberación de compuestos complejados, además de optimizar las condiciones para el metabolismo microbiano.

En el contexto del presente estudio, estos resultados respaldan la hipótesis de que intervenciones biotecnológicas dirigidas a la matriz del mucílago, ya sea mediante enzimas exógenas como la PTE o extractos frutales naturalmente ricos en pectinas, pueden influir positivamente en la dinámica fermentativa y en la generación de precursores químicos de aroma.

Este paralelismo sugiere que la sinergia entre la microbiota inoculada, los extractos frutales y los componentes pécticos no solo contribuye a un entorno más eficiente de fermentación, sino que también favorece la formación de metabolitos volátiles responsables de las notas frutales, tostadas y a nuez observadas en el licor de cacao de mayor calidad. Las variables proteína y energía respondieron principalmente al componente genético, lo cual es coherente con caracterizaciones químicas recientes que muestran diferencias intrínsecas en la fracción lipídica y proteica entre genotipos como CCN-51 y otros materiales finos; Vera⁽³⁰⁾ documentaron variaciones en perfiles de ácidos grasos y compuestos fenólicos entre cultivares, reforzando la interpretación de que la proteína y el contenido energético dependen mayoritariamente de la genética y en efecto indica también que respecto a la ceniza, la falta de efectos principales y la significancia exclusiva en la interacción EM% $\times$ Extractos refleja modificaciones minerales indirectas asociadas a procesos de lixiviación del mucílago.

Desde la perspectiva sensorial, los resultados evidencian que el perfil organoléptico puede modularse mediante la integración de factores biotecnológicos y genéticos. Vásquez⁽³¹⁾ mostraron cambios en el perfil volátil y sensorial de cacaos ecuatorianos en función de la práctica de fermentación y del genotipo, lo que respalda lo observado en esta investigación: CCN-51 presentó una coloración e intensidad cromática más homogéneas vinculadas a una mayor actividad oxidativa de polifenoles, mientras que la variedad Nacional mostró mayor variabilidad dependiente del extracto aplicado.

Finalmente, el desarrollo de aromas, sabores y regustos diferenciados entre tratamientos confirma que los extractos frutales y los microorganismos eficientes actúan como potenciadores sensoriales. Vásquez⁽³²⁾ han documentado que la inoculación controlada y la suplementación con sustratos ricos en azúcares favorecen la formación de precursores volátiles (aldehídos, alcoholes, ésteres y pirazinas) que, tras el proceso de tostado, contribuyen a las notas frutales, tostadas y de nuez observadas por Vásquez⁽⁷⁾. En estudios similares Korcari⁽⁸⁾ evidenciaron que la inoculación con bacterias ácido-lácticas seleccionadas mejora la expresión de notas frutales y reduce amargor, confirmando el potencial de los coadyuvantes frutales como moduladores sensoriales. En conjunto, los datos indican que la integración de microorganismos eficientes y extractos frutales permiten dirigir el desarrollo químico y sensorial del licor de cacao, potenciando atributos diferenciados según el genotipo y respaldando la aplicación de bioprocesos combinados para la producción de cacaos de alto valor sensorial y tecnológico.⁽³³⁾

CONCLUSIONES

En síntesis, la fermentación controlada del cacao mediante la coaplicación de microorganismos eficientes (EM) y extractos frutales naturales moduló significativamente la bioquímica fermentativa y la expresión sensorial del licor de cacao, evidenciando que la interacción entre microbiota, sustratos frutales y genotipo es determinante en la generación de atributos diferenciados. Los tratamientos con 80 % de EM combinados con extractos de maracuyá y banano promovieron una mayor acidificación, reducción de humedad y homogeneidad cromática, sustentadas en la intensificación de rutas ácido-lácticas y acético-oxidativas. El componente genético influyó principalmente en la composición proteica y energética, definiendo la capacidad de acumulación de metabolitos estructurales y precursores aromáticos, mientras que los factores tecnológicos determinaron la transformación fermentativa y la expresión sensorial final.

Desde el punto de vista sensorial, CCN-51 mostró perfiles frutales-cacao equilibrados y una cromaticidad

uniforme, mientras que Nacional expresó mayor complejidad, con notas tostadas y regustos persistentes asociados a su composición fenólica y comportamiento microbiano. Finalmente, la integración de estrategias biotecnológicas, como la inoculación dirigida y el uso de extractos frutales, constituye una vía sostenible para optimizar los perfiles químicos y sensoriales del cacao fermentado, fortaleciendo la producción de cacaos de alto valor sensorial y tecnológico orientados a la diferenciación de origen y a mercados especializados.

AGRADECIMIENTOS

El autor desea agradecer a la Dra. Silvia Cristina Clavijo Velázquez, de la Facultad de Ciencias Aplicadas a la Industria de la Universidad Nacional de Cuyo (San Rafael, Argentina), por su dirección académica en el marco del Doctorado en Ingeniería de Productos y Procesos de la Industria Alimentaria. Asimismo, agradece el apoyo del Dr. Manuel Danilo Carrillo Zenteno, del Departamento de Suelos y Aguas del INIAP-Extensión Tropical Pichilingue, institución donde se llevó a cabo la fase experimental y por su cotutoría. Igualmente, se extiende el agradecimiento al M.Sc. Vicente Guerrón Troya, de la Universidad Técnica Estatal de Quevedo, y al M.Sc. Jhoan Alfredo Plua Montiel, de la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE y la Universidad Técnica de Babahoyo por la contribución a esta investigación. Al Rector, Dr. Marcos David Oviedo Rodríguez; al Vicerrector de Investigación y Estudios de Posgrado, Dr. Daysi Beatriz Soto Calderón, así como al Decano de la Facultad de Ciencias Agrícolas, Álvaro Martín Pazmiño Pérez, M.Sc. El primer autor agradece a Dios, a sus padres, a su esposa, Sanyi Lorena Rodríguez Cevallos, M.Sc. (c), y a su familia, quienes fueron pilares de apoyo en su investigación y en su vida.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Vásquez L, Alvarado K, Intriago F, Raju N, Prasad R. Banana and apple extracts with efficient microorganisms and their effect on cadmium reduction in cocoa beans (*Theobroma cacao* L.). *Discover Food*. 2024;4(163):1-13. <https://doi.org/10.1007/s44187-024-00205-5>
2. Intriago F, Alvarado K, Vera J, Vásquez L, Tigselema S, Verduga C. Post-harvest quality of cacao (*Theobroma cacao* L.) for the chocolate industry. In: García L, Naga M, Zambrano F, Aguilar D, editors. *Sustainable Cacao Cultivation in Latin America*. 1st ed. London: Routledge; 2024. p. 270-91. <https://www.taylorfrancis.com/chapters/edit/10.4324/9781003381761-17/post-harvest-quality-cacao-theobroma-cacao-chocolate-industry-frank-intriago-flor-kerly-alvarado-vásquez-jaime-vera-chang-luis-vásquez-cortez-solanyi-tigselema-zambrano-cristhian-verduga>
3. Vera J, Vásquez L, Alvarado K, Intriago F, Raju M, Radice M. Physical and Organoleptic Evaluation of 12 Cocoa Clones (*Theobroma cacao* L.) of National Type, in Cocoa Liquor—a Study from Ecuador. *Syst Smart Technol Innov Soc*. 2024;870:199-211. 10.1007/978-3-031-51982-6_18
4. Campos S, Martínez W, Reis G, Ocán D, Santos G, Rosas F, et al. The role of microbial dynamics, sensorial compounds, and producing regions in cocoa fermentation. *Microbiol Res (Pavia)*. 2025;16(4):1-34. https://www.mdpi.com/2036-7481/16/4/75?utm_source=chatgpt.com
5. Vera J, Benavides J, Vásquez L, Alvarado K, Reyes J, Intriago F, et al. Effects of two fermentative methods on cacao (*Theobroma cacao* L.) Trinitario, induced with *Rhizobium japonicum* to reduce cadmium. *Rev Colomb Investig Agroindustriales*. 2023;10(1):95-106. <https://doi.org/10.23850/24220582.5460>
6. Vásquez L, Vera J, Erazo C, Intriago F. Induction of *Rhizobium japonicum* in the fermentative mass of two varieties of cacao (*Theobroma Cacao* L.) as a strategy for the decrease of cadmium. *Int J Health Sci (Qassim)*. 2022;3(April):11354-71. <https://sciencescholar.us/journal/index.php/ijhs/article/view/8672/5762>
7. Vásquez L, Montoya E, Cadenas L, Plua J, Camacho C, Cobos F, et al. Evaluación físico química y sensorial del cacao (*Theobroma cacao* L.) CCN51 fermentado con *Saccharomyces cerevisiae* y extracto de fruta (Mango manila) en diferentes grados de madurez. *Nutr Clin y Diet Hosp*. 2025;45(3):117-28.
8. Korcari D, Fanton A, Ricci G, Rabitti N, Laureati M, Hogenboom J, et al. Fine cocoa fermentation with selected lactic acid bacteria : composition and sensory properties. *Foods*. 2023;12(1):1-15. <https://www.mdpi.com/2304-8158/12/2/340>
9. Cedeño J, Parraga C, Intriago F. Induction of effective microorganisms (EM) in the fermenting mass of cacao (*Theobroma cacao* L.) and their impact on physicochemical and antioxidant characteristics. *Biotecnia*. 2023;26(e2422):1-8. <https://doi.org/10.18633/biotecnia.v26.2422>

10. Peña M, Ortiz J, Santander F, Lazo M, Caroca R. Physicochemical changes during controlled laboratory fermentation of cocoa (CCN-51) with the inclusion of fruits and on-farm inoculation. *Brazilian J Food Technol.* 2023;26:1-9. <https://www.scielo.br/j/bjft/a/yc7QZvLwpxx8JZS639ycszH/?lang=en>
11. Vera F, Vera J. Resumen de principios de diseños experimentales. 1st ed. Compás G, editor. Guayaquil Ecuador; 2018. 102 p. <https://repositorio.uteq.edu.ec/handle/43000/3764>
12. Vásquez L, Erazo C, Vera J, Intriago F. Induction of *Rhizobium japonicum* in the fermentative mass of two varieties of cacao (*Theobroma cacao* L.) as a strategy for the decrease of cadmium. *Int J od Heal Sci.* 2022;6(3):11354-71. 10.53730/ijhs.v6nS3.8672
13. Torres A, Vera J, Vásquez L, Alvarado K, Intriago F. Extraction of Cocoa Powder for the Preparation of a Drink by Adding Mucilage and Guava. *Sarhad J Agric.* 2023;39(2):10-8. <https://dx.doi.org/10.17582/journal.sja/2023/39/s2.10.18>
14. Vera J, Vásquez L, Alvarado K, Intriago F, Raju M, Radice M. Physical and organoleptic evaluation of 12 cocoa clones (*Theobroma cacao* L.) of National type, in Cocoa liquor – a study from Ecuador. *Syst Smart Technol Innov Soc.* 2024;870:8-15.
15. Intriago F, Cedeño J, Parraga C, Alvarado K, Vásquez L, Revilla K, et al. Induction of effective microorganisms (EM) in the fermenting mass of cacao (*Theobroma cacao* L.) and their impact on physicochemical and antioxidant characteristics. *Biotecnia.* 2024;26(2422):1-8. <https://doi.org/10.18633/biotecnia.v26.2422>
16. Morales W, Morante J, Herrera R, Ayuso M, Bernalte M. Efecto de la adición de levaduras y enzimas durante la fermentación sobre la calidad fisicoquímica de los granos de cacao fino de aroma. *J Agric Food Res.* 2024;16(101126):1-43.
17. Viera W, Shinohara T, Samaniego I, Terada N, Sanada A, Ron L, et al. Pulp Mineral Content of Passion Fruit Germplasm Grown in Ecuador and Its Relationship with Fruit Quality Traits. *Plants.* 2022;11(5):1-19. <https://www.mdpi.com/2223-7747/11/5/697#B93-plants-11-00697>
18. Kinetics E, Polyphenol OF, From O, Michel G, Different T, Stages M. Cinética enzimática de la polifenol oxidasa del banano gros michel en diferentes estados de maduración. *Rev La Fac Química Farmecéutica.* 2006;13(2):13-9. https://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0121-40042006000200002
19. Vásquez L, Durazno L, Rivadeneira C, Vera J, Arboleda L, Intriago F. Utilización De extracto de Jackfruit (*Artocarpus heterophyllus*) como estrategia para mejorar la calidad del grano de cacao. *Rev Científica Multidiscip InvestiGo.* 2023;4(8):95-117. <https://www.revistainvestigo.com/EditorInvestigo/index.php/hm/article/view/67>
20. Vera J, Vasquez L, Zapata K, Cevallos R. Caracterización morfológica, fisicoquímica y microbiológica del cacao Macambo (*Theobroma bicolor* Humb & Bonpl.) en Ecuador. *Rev Agrotecnología Amaz.* 2024;4(2):1-17. <https://doi.org/10.51252/raa.v4i2.657>
21. Thairy L. Estudio de las características organolépticas del chocolate influenciado por el efecto de diferentes agentes fermentadores (Microorganismos). Universidad de las Fuerzas Armadas; 2024. <https://repositorio.espe.edu.ec/items/9120e2fa-d653-4ba8-8c4f-e77e358f3b85>
22. Vera J, Radice M, Vásquez L, Intriago F. Perfil químico de 12 clones tipo nacional de pasta de cacao (*Theobroma cacao* L.). *Univ y Soc.* 2024;16(1):126-36. http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2218-36202024000100126
23. Díaz C, Luc V. Functional yeast starter cultures for cocoa fermentation. *J Appl Microbiol.* 2022;133(1):39-66. <https://academic.oup.com/jambio/article/133/1/39/6989019>
24. Voorde D, Díaz C, Hernandez C, Weckx S, Vuyst L. Yeast strains do have an impact on the production of cured cocoa beans, as assessed with Costa Rican Trinitario cocoa fermentation processes and chocolates thereof. *Front Microbiol.* 2023;14:1-27.
25. Herrera F, Cala M, Aguirre J, Rodríguez C, Chica M, Olarte H, et al. Dissecting fine-flavor cocoa

bean fermentation through metabolomics analysis to break down the current metabolic paradigm. Sci Rep. 2021;11(1):1-18. <https://www.nature.com/articles/s41598-021-01427-8>

26. Vásquez L, Cevallos C, Uvidia M, Segobia S, Plua J. Evaluación de métodos fermentativos de cacao Nacional y CCN-51, induciendo microorganismos en yute y cajas Rohan para mejora organoleptica. Rev Luna Azul. 2025;(60):168-81.

27. Chagas R, Andrade S, Denadai M, Nunes M, Narain N. Evaluation of bioactive compounds potential and antioxidant activity in some Brazilian exotic fruit residues. Food Res Int. 2017;102:84-92.

28. Rahayu E, Triyadi R, Khusna R, Djaafar T, Utami T, Marwati T, et al. Indigenous yeast, lactic acid bacteria, and acetic acid bacteria from cocoa bean fermentation in indonesia can inhibit fungal-growth-producing mycotoxins. Fermentation. 2021;7(192):1-11.

29. Morales W, Morante J, Carranza M, Ormaza D, Concepción M, Bernalte M. Fermentation with pectin trans-eliminase to reduce cadmium levels in nacional and CCN-51 cocoa bean genotypes. Plants. 2025;14(16):1-23. <https://www.mdpi.com/2223-7747/14/16/2553>

30. Vera J, Radice M, Vásquez L, Intriago F. Peril químico de 12 clones tipo Nacional de pasta de cacao (Theobroma cacao L.). Univeridad Y Soc. 2024;16(1):126-36.

31. Vásquez L, Rodríguez S, Cadena L, PLua J, Camacho C, Cobos F, et al. Aroma, Ciencia y Tradición: Nuevas fronteras en la fermentación del cacao. 1st ed. Rodríguez S, Rojas J, editors. Ediciones GESICAP.; 2025. 1-126 p. <https://edicionesgesicap.com/index.php/gesicap/catalog/book/47>

32. Vasquez L, Alvarado K, Intriago F, Vera J, Raju N, Prasad R. Banana and apple extracts with efficient microorganisms and their effect on cadmium reduction in cocoa beans (Theobroma cacao L.). Discov Food. 2024;4(1):1-13. <https://link.springer.com/article/10.1007/s44187-024-00205-5>

33. Intriago F, Vera J, Vásquez L, Alvarado K. Inducción anaeróbica de Bradyrhizobium japonicum en la postcosecha de híbridos experimentales de cacao y su mejoramiento en la calidad fermentativa. J Sci Res UTB. 2022;7(2):19-23.

FINANCIACIÓN

Los autores no recibieron financiación para el desarrollo de la presente investigación.

CONFLICTO DE INTERESES

Los autores declaran que no existe conflicto de intereses.

CONTRIBUCIÓN DE AUTORÍA

Conceptualización: Luis Humberto Vásquez Cortez, Silvia Cristina Clavijo Velázquez.

Curación de datos: Luis Humberto Vásquez Cortez, Sanyi Lorena Rodríguez Cevallos, Carol Daniela Coello Loo, Silvia Cristina Clavijo Velázquez.

Análisis formal: Luis Humberto Vásquez Cortez, Silvia Cristina Clavijo Velázquez.

Investigación: Luis Humberto Vásquez Cortez, Silvia Cristina Clavijo Velázquez.

Metodología: Luis Humberto Vásquez Cortez, Silvia Cristina Clavijo Velázquez.

Administración del proyecto: Luis Humberto Vásquez Cortez, Silvia Cristina Clavijo Velázquez, Sanyi Lorena Rodríguez Cevallos.

Recursos: Luis Humberto Vásquez Cortez, Sanyi Lorena Rodríguez Cevallos, Manuel Danilo Carrillo Zenteno.

Software: Luis Humberto Vásquez Cortez, Sanyi Lorena Rodríguez Cevallos, Carol Daniela Coello Loo, Manuel Danilo Carrillo Zenteno.

Supervisión: Silvia Cristina Clavijo Velázquez, Manuel Danilo Carrillo Zenteno.

Validación: Silvia Cristina Clavijo Velázquez, Manuel Danilo Carrillo Zenteno.

Visualización: Silvia Cristina Clavijo Velázquez.

Redacción - borrador original: Luis Humberto Vásquez Cortez, Silvia Cristina Clavijo Velázquez.

Redacción - revisión y edición: Luis Humberto Vásquez Cortez, Silvia Cristina Clavijo Velázquez.