

UNIVERSIDAD NACIONAL DE UCAYALI
FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS
ESCUELA PROFESIONAL DE INGENIERÍA AGROINDUSTRIAL



**“AISLAMIENTO Y SELECCIÓN DE LEVADURAS
NATIVAS CAPACES DE PRODUCIR ALTOS
RENDIMIENTOS DE ALCOHOL EMPLEANDO COMO
SUSTRATO EL EXUDADO DE CACAO (*Theobroma
cacao L.*) CLON CCN-51 EN EL DISTRITO DE SAN
ALEJANDRO”**

**TESIS PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE
INGENIERO AGROINDUSTRIAL**

ELVIS JHONATAN VILA AVENDAÑO

PUCALLPA – PERÚ

2018



UNIVERSIDAD NACIONAL DE UCAYALI
FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS



ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS

En Pucallpa, a los... 04 días del mes de... ENERO del 2018
Siendo las... 11.45 AM horas y de acuerdo a lo señalado en el Reglamento de Grados y Títulos de la Universidad Nacional de Ucayali, se reunieron los integrantes del Jurado Calificador nombrados por la DECANATURA, con documento:

MEMORANDO MULTIPLE N° 126/2017 - UNU - VROCO - D - FCA

Para proceder a la sustentación pública de tesis Titulada:

"AISLAMIENTO Y SELECCION DE LEVADURAS NATIVAS CAPACES DE PRODUCIR ALTOS RENDIMIENTOS DE ALCOHOL EMPLEANDO COMO SUSTRATO EL EXUDADO DE CACAO (Theobroma cacao L) CLON CCN-51 EN EL DISTRITO DE SAN ALEJANDRO"

Presentado por el (la) Bachiller en Ingeniería Agroindustrial.....

ELVIS JHONATAN VILA AYENDANO..... ante el Jurado

Conformado por los siguientes catedráticos:

DR. CARLOS PANDURO CORBAJOL..... (Presidente)

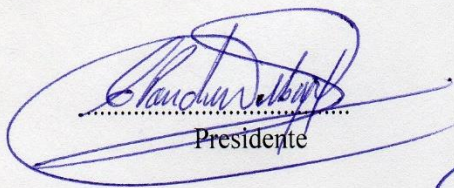
DR. EDEGADO GARCIA SAAVEDRA..... (Secretario)

ING. ROGER FERNANDO PANDURO BORTAD..... (Miembro)

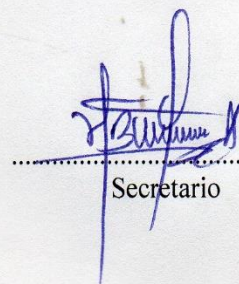
Finalizada la sustentación de la misma se procedió a la evaluación respectiva y en seguida se deliberó llegando a las siguientes conclusiones: el (la) tesista ha sido

APROBADO..... por UNANIMIDAD..... quedando el (la) graduado (a) expedito para que se otorgue el Título Profesional de Ingeniero Agroindustrial.

Siendo las... 12.50 PM.... Horas del mismo día se dio por concluido la Ceremonia.


Presidente


Miembro


Secretario

DEDICATORIA.

A mi familia: Pascuala, Modesto, Henry,
Kevin y Maycol.

AGRADECIMIENTO.

Expreso mis más sinceros agradecimientos a las personas e instituciones que han contribuido en la ejecución de la presente tesis:

- Al Biólogo Emilio Pascual Valentín por ayudarme y facilitarme los ambientes del Laboratorio de Microbiología y Parasitología de la Facultad de Ciencias de la Salud para la realización de este trabajo de investigación.
- Al Ing. Roberto Tuesta del laboratorio de Química, al Ing. Edgar Vicente Santa Cruz y al Dr. Edgardo García Saavedra del laboratorio Especializado de Agroindustria.
- Al técnico Juan Huaycama del laboratorio de Suelos y al Sr. Dante Pizarro por facilitarme el exudado de cacao CCN-51.
- A la Ing. Glendy Sánchez Sunción por el asesoramiento de este trabajo de investigación.
- A la Ing. Cristina Quiñones Ruiz, por el importante apoyo que me brindo.
- Y por último agradezco a mis amigos y colegas que me apoyaron en la ejecución de este trabajo de investigación.

Esta tesis fue aprobada por el Jurado evaluador designado por la Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad Nacional de Ucayali, como requisito para optar el título de Ingeniero Agroindustrial:

Dr. Carlos Panduro Carbajal.

Presidente

Dr. Edgardo García Saavedra.

Secretario

Ing. Roger Fernando Panduro Bartra, Mg.

Miembro

Ing. Glendy Sánchez Sunción, M.Sc.

Asesora

Ing. Cristina Quiñones Ruiz, M.Sc.

Co-Asesora

Bach. Elvis Jhonatan Vila Avendaño.

Tesista

ÍNDICE.

RESUMEN.....	ix
SUMMARY.....	xi
I. INTRODUCCIÓN.....	1
II. REVISIÓN DE LITERATURA.....	3
2.1. ANTECEDENTES.....	3
2.2. GENERALIDADES DEL CACAO CCN-51.	5
2.2.1. Clasificación taxonómica.....	5
2.2.2. Producción de cacao.....	6
2.3. EXUDADO DE CACAO CCN-51.....	7
2.3.1. Composición química del exudado de cacao CCN-51.....	7
2.4. LEVADURAS.....	8
2.4.1. Definición.	8
2.4.2. Clasificación.	8
2.4.3. Características generales.	9
2.4.4. <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	10
2.4.4.1. Requerimientos nutricionales.....	11
2.4.4.2. Requerimientos físico-químicos.....	12
2.4.4.3. Composición química.....	12
2.4.5. Levaduras nativas.....	13
2.4.6. Importancia.....	13
2.5. AISLAMIENTO DE LEVADURAS.....	14
2.5.1. Cepa.....	14
2.5.2. La esterilización de los materiales.....	14

2.5.3. Calor húmedo.....	14
2.5.4. Calor seco.....	15
2.6. CÁMARA NEUBAHUER.....	15
2.7. FERMENTACIÓN ALCOHÓLICA.....	16
2.8. LA CARMELIZACIÓN DE SOLUCIONES AZUCARADAS.....	18
III. MATERIALES Y MÉTODOS.....	20
3.1. UBICACIÓN DEL ESTUDIO.....	20
3.1.1. Trabajo de campo.....	20
3.1.2. Trabajo de laboratorio.....	20
3.2. MATERIALES.....	20
3.3. INSUMOS.....	21
3.4. EQUIPOS.....	21
3.5. REACTIVOS.....	22
3.6. METODOLOGÍA.....	23
3.6.1. Toma de muestras.....	23
3.6.2. Preparación de muestras.....	24
3.6.3. Siembra de microorganismos.....	26
3.6.4. Aislamiento y obtención de cepas.....	27
3.6.5. Obtención de levaduras en suspensión.....	28
3.6.6. Determinación de concentración celular.....	28
3.6.7. Estandarización de concentración de las cepas.....	29
3.6.8. Fermentación de caldo YPD.....	30
3.6.9. Selección de cepas por prueba de yodoformo.....	30
3.6.10. Fermentación de exudado de cacao CCN-51.....	31
3.6.11. Determinación de alcohol.....	33

3.6.12. Análisis químico proximal del exudado.....	33
3.7. DISEÑO ESTADÍSTICO DE LA INVESTIGACIÓN.....	33
3.7.1. Diseño Experimental.....	33
3.7.2. Tratamientos.....	34
3.7.3. Análisis estadístico.....	34
3.7.4. Tipo y nivel de investigación.....	35
3.7.5. Población y muestra.....	35
3.8. MEDICIÓN DE VARIABLES.....	35
3.8.1. Variables independientes.....	35
3.8.2. Variables de pendientes.....	35
3.8.3. Descripción de técnica e instrumentos de recolección de datos.....	36
IV. RESULTADOS Y DISCUSIONES.....	37
4.1. AISLAMIENTO DE LEVADURAS NATIVAS.....	37
4.1.1. Muestreo y aislamiento.....	37
4.1.2. Obtención de cepas en suspensión.....	40
4.1.3. Microscopia de las cepas nativas aisladas.....	42
4.1.4. Concentración celular y obtención de inóculos.....	43
4.2. SELECCIÓN DE CEPAS DE LEVADURAS NATIVAS.....	45
4.2.1. Fermentación de caldo YPD.....	45
4.2.2. Prueba de yodoformo.....	46
4.3. ANÁLISIS QUÍMICO PROXIMAL DE EXUDADO.....	47
4.4. FERMENTACIÓN DE EXUDADO DE CACAO CCN-51.....	48
4.4.1. Consumo de °Brix.....	50
4.4.2. Tiempo de fermentación.....	55

4.4.3. Concentración celular.....	58
4.4.4. Producción y rendimiento alcohólico.....	60
V. CONCLUSIONES.....	66
VI. RECOMENDACIONES.....	67
VII. LITERATURA CITADA.....	68
VIII. ANEXO.....	75

RESUMEN.

El presente trabajo investigó la obtención de alcohol, empleando el exudado de cacao clon CCN-51 como sustrato para la fermentación, utilizando como inóculos levaduras nativas aisladas y seleccionadas procedentes el área de fermentación del grano de cacao clon CCN-51 en el distrito de San Alejandro - Ucayali. Las levaduras nativas fueron aisladas de cuatro muestras: Tierra, exudado de cacao CCN-51, hojas secas y cáscara de cacao. Se logró aislar 7 cepas de levaduras en total: 2 de la muestra de tierra (L4 y L7), 1 de la muestra de exudado de cacao (L5), 2 de las hojas secas (L6 y L3) y 2 de la cascara de cacao (L2 y L1). Luego del aislamiento se realizó la prueba de Yodoformo para la selección de levaduras que producían alcohol, de las que fueron seleccionadas 3 levaduras: L1, L3 y L4 siendo estas los tratamientos T2, T3 y T4 respectivamente. Estas tres cepas de levaduras nativas y la levadura control *S. cerevisiae* comercial (T1) fueron usadas para la fermentación de exudado de cacao CCN-51.

Las levaduras fueron inoculadas en una proporción de 1,5% v/v en relación al sustrato (exudado de cacao CCN-51 estéril) además la concentración de los inóculos fue 10^7 células/ml. Se realizó evaluaciones sobre las variables respuestas como el consumo de °Brix, concentración celular final (células/ml), tiempo de fermentación (h), y la producción de alcohol (°GL). Se determinó que la levadura L4 (T4) tuvo una producción promedio de $8,6 \pm 0,1$ °GL, fue la levadura que produjo alcohol en la misma proporción que la levadura control *S. cerevisiae* (T1) que tuvo una producción promedio de $8,6 \pm 0,057$ °GL, estos dos tratamiento no presentaron diferencias estadísticas en la prueba de Dunnett ($p < 0,05$) en producción alcohólica, consumo de °Brix y tiempo de fermentación;

más en la concentración celular final si presento diferencias estadísticas. Por otro lado el T2 y T3 si presentaron diferencias estadísticas al producir alcohol en proporciones inferiores ($0,6 \pm 0,057$ y 0°GL respectivamente) en la prueba de Dunnett ($p>0,05$) al compararlas con el tratamiento control (T1). El T2 y T3 también presentaron diferencias estadísticas en las otras variables respuesta al compararlas con el tratamiento control (T1). Estas diferencias se deben a las características fermentativas inherentes de las levaduras nativas seleccionadas y las condiciones del proceso de fermentación del exudado de cacao. Se concluyó que de todas las levaduras nativas aisladas procedentes del área de fermentación de cacao CCN-51 la cepa L4 (T4) es la más adecuada para la producción de etanol y derivados alimenticios como vino, vinagre y otros.

Palabras clave: Aislamiento, selección, cacao CCN-51, exudado, levaduras nativas, fermentación alcohólica, rendimiento.

SUMMARY.

The present study investigated the production of alcohol, using the exudate of cacao clone CCN-51 as a substrate for fermentation, using native yeasts isolated as inoculum and selected from the area of fermentation of cocoa bean clone CCN-51 in the district of San Alejandro - Ucayali. Native yeasts were isolated from four samples: Earth, exudate of cocoa CCN-51, dry leaves and rind of cocoa. Seven was isolated strains of yeasts: 2 of the soil sample (L4 and L7), 1 of the sample of exudate of cocoa (L5), 2 of the dry leaves (L6 and L3) and 2 of the peel of cacao (L2 and L1). After the isolation was made the iodoform test for the selection of yeast producing alcohol, of which 3 were selected yeasts: L1, L3 and L4 being these treatments T2, T3 and T4, respectively. These three native strains of yeasts and the commercial control yeast *S. cerevisiae* (T1) were used for the fermentation of cocoa exudate CCN-51.

The yeasts were inoculated at a rate of 1.5% v/v in relation to the substrate (sterile exudate of cocoa CCN-51) in addition to the concentration of the inoculum was 10^7 cells/ml. It managed conducted assessments on the response variables as the consumption of °Brix, cell concentration (cells/ml), fermentation time (h), and the production of alcohol (°GL). It was determined that the yeast L4 (T4) had an average production of $8.6 \pm 0.1^\circ\text{GL}$, was the yeast to produce alcohol in the same proportion as the control yeast *S. cerevisiae* (T1) that had an average production of $8.6 \pm 0.057^\circ\text{GL}$, these two treatment showed no statistical differences in the Dunnet's test ($p < 0.05$) in production, consumption of alcoholic °Brix and fermentation time; more in the cell concentration end if presented statistical differences. On the other hand, the T2 and T3 if presented statistical differences to produce alcohol in lower rates (0.057 and $0 \pm 0.6^\circ\text{GL}$

respectively) in the Dunnet's test ($p>0.05$) when compared with the control treatment (T1). The T2 and T3 also presented statistical differences in the other response variables when compared with the control treatment (T1). These differences are due to the fermenting inherent characteristics of selected native yeasts and the conditions of the fermentation process of the exudate of cocoa. It was concluded that of all the native yeasts isolated from the fermentation of cocoa CCN-51 strain L4 (T4) is the most suitable for the production of ethanol and by-products such as wine, vinegar and others.

Keywords: Isolation, selection, cocoa CCN-51, exuded, native yeasts, alcoholic fermentation, yield.

LISTA DE CUADROS.

En texto:	Pág.
Cuadro 1. Clasificación taxonómica del cacao.....	5
Cuadro 2. Producción nacional y regional de cacao.....	7
Cuadro 3. Constituyentes del exudado de cacao.....	8
Cuadro 4. Composición química de las levaduras.....	13
Cuadro 5. Parámetros de fermentación de caldo YPD.....	30
Cuadro 6. Esquema ANVA.....	35
Cuadro 7. Codificación y descripción de muestras para el aislamiento levaduras nativas del área de fermentación de cacao CCN- 51. San Alejandro, Ucayali – Perú.....	37
Cuadro 8. Observaciones de placas Petri en la siembra de microorganismos (en medio YPD selectivo para levaduras) de muestras para el aislamiento de levaduras nativas del área de fermentación de cacao CCN-51. San Alejandro, Ucayali – Perú.....	38
Cuadro 9. Observaciones y características cepas de levaduras nativas aisladas del área de fermentación de cacao CCN- 51 (medio PDA). San Alejandro, Ucayali – Perú.....	39
Cuadro 10. Crecimiento de cepas de levaduras nativas aisladas del área de fermentación de cacao CCN-51. San Alejandro, Ucayali-Perú en caldo YPD a las 24 h.....	41

Cuadro 11.	Características microscópicas de las cepas de levaduras nativas aisladas del área de fermentación de cacao CCN-51. San Alejandro, Ucayali-Perú.....	42
Cuadro 12.	Conteo de levaduras en cámara Neubauer y obtención de inóculos de cepas aisladas del área de fermentación de cacao CCN-51. San Alejandro, Ucayali-Perú.....	44
Cuadro 13.	Fermentación en caldo YPD de las siete cepas de levaduras nativas aisladas del área de fermentación de cacao CCN-51. San Alejandro, Ucayali-Perú.....	45
Cuadro 14.	Evaluación cualitativa para la selección de levaduras productoras de alcohol aisladas del área de fermentación de cacao CCN51. San Alejandro, Ucayali-Perú.....	46
Cuadro 15.	Análisis de pH y °Brix de exudado de cacao CCN-51 y exudado autoclavado CCN-51 procedente de San Alejandro, Ucayali-Perú.....	47
Cuadro 16.	Resumen de los principales datos de la fermentación de exudado de cacao CCN-51 empleando como inóculo cepas de levaduras nativas aisladas del área de fermentación de cacao CCN-51. San Alejandro, Ucayali-Perú.....	49
Cuadro 17.	Consumo de °Brix en los diferentes tratamientos en la fermentación de exudado de cacao CCN-51. San Alejandro, Ucayali-Perú.....	54
Cuadro 18.	Tiempo de fermentación de exudado de cacao CCN-51. San Alejandro, Ucayali-Perú.....	56

Cuadro 19.	Incremento de concentración celular en la fermentación de exudado de cacao CCN-51. San Alejandro, Ucayali-Perú.....	59
Cuadro 20.	Producción de alcohol en la fermentación de exudado de cacao CCN-CCN-51. San Alejandro, Ucayali – Perú.....	61
Cuadro 21.	Rendimiento de producción de alcohol utilizando como sustrato exudado de cacao CCN-51. San Alejandro, Ucayali-Perú.....	65
En el anexo:		
Cuadro 22A.	ANVA de producción alcohólica °GL en la fermentación de exudado de cacao CCN-51.....	76
Cuadro 23A.	Prueba Dunnett para la producción alcohólica °GL en la fermentación de exudado de cacao CCN-51.....	77
Cuadro 24A.	ANVA para el consumo de °Brix en la fermentación de exudado de cacao CCN-51.....	77
Cuadro 25A.	Prueba Dunnett para el consumo de °Brix en la fermentación de exudado de cacao CCN-51.....	78
Cuadro 26A.	ANVA en la concentración celular final en la fermentación de exudado de cacao CCN-51.....	78
Cuadro 27A.	Prueba Dunnett para la concentración celular en la fermentación de exudado de cacao CCN-51.....	79
Cuadro 28A.	ANVA en el tiempo de fermentación de exudado de cacao CCN-51.....	79
Cuadro 29A.	Prueba de Dunnett para el tiempo de fermentación del exudado de cacao CCN-51.....	80

LISTA DE FIGURAS.

En texto:	Pág.
Figura 1. Seguimiento de reacciones para obtener etanol a partir de glucosa.....	17
Figura 2. Etapas de la ejecución del proyecto de investigación.....	23
Figura 3. Dilución seriada de muestras para siembra.....	26
Figura 4. Fermentación de exudado de cacao CCN-51. Curva de °Brix en <i>S. cerevisiae</i> (T1). San Alejandro, Ucayali – Perú.....	50
Figura 5. Fermentación de exudado de cacao CCN-51. Curva de °Brix en L1 (T2). San Alejandro, Ucayali – Perú.....	51
Figura 6. Fermentación de exudado de cacao CCN-51. Curva de °Brix en L3 (T3). San Alejandro, Ucayali – Perú.....	52
Figura 7. Fermentación de exudado de cacao CCN-51. Curva de °Brix en L4 (T4). San Alejandro, Ucayali – Perú.....	53
Figura 8. Comparación entre tratamiento (levaduras) en utilización de °Brix en el proceso de fermentación de exudado de cacao CCN-51. San Alejandro, Ucayali – Perú.....	54
Figura 9. Tiempo transcurrido de los tratamientos al concluir el proceso de fermentación de exudado de cacao CCN-51 San Alejandro, Ucayali-Perú.....	56
Figura 10. Concentración celular inicial y final para los tratamientos en el proceso de fermentación de exudado de cacao CCN-51. San Alejandro, Ucayali – Perú.....	59

Figura 11.	Producción de alcohol de los diferentes tratamientos al concluir la fermentación de exudado de cacao CCN-51. San Alejandro, Ucayali-Perú.....	60
------------	---	----

En el anexo:

Figura 12A.	Distribución de las unidades experimentales con DCA.....	76
Figura 13A.	Forma de contar levaduras en cámara Neubauer.....	85
Figura 14A.	Corchos y fermentador de exudado.....	86
Figura 15A.	Tubos de prueba de yodoformo comparados con el blanco.....	87
Figura 16A.	Recolección de muestras en el área de fermentación de cacao CCN-51.....	89
Figura 17A.	Trabajo de aislamiento en laboratorio.....	89
Figura 18A.	Levaduras sembradas por estría en medio YPD.....	90
Figura 19A.	Cepas de levaduras nativas en medio PDA.....	90
Figura 20A.	Levaduras en medio líquido (caldo YPD).....	91
Figura 21A.	Microscopia cepa L4 (izquierda) y cepa L3 (derecha) en cámara Neubauer.....	91
Figura 22A.	Fermentación de caldo YPD y exudado de cacao CCN-51 autoclavado con las cepas aisladas.....	92
Figura 23A.	Refractómetro digital y lectura de °GL en el alcoholímetro.....	92

I. INTRODUCCIÓN.

El cultivo de cacao en la región Ucayali y el país se encuentra en crecimiento según lo indica el Instituto Nacional de Estadística e Informática (INEI), la producción de cacao en Ucayali en el año 2016 fue de 8622 toneladas con una variación anual de 28,6% con respecto al año 2015 (INEI 2017), además la demanda mundial de producción de cacao tendrá un crecimiento de 27% hacia el 2020 (AGRARIA 2015), proyección muy satisfactoria para este producto.

Para transformar el cacao en un producto de valor se debe realizar procesos tales como la cosecha, recolección, selección, partido y desgranado; además fermentación, secado y almacenamiento para conservarlo adecuadamente hasta su proceso industrial (Alarcon 2013). Los productores de cacao al momento de la fermentación desperdician el exudado de las primeras horas de fermentación, que podrían ser utilizados en la elaboración de otros productos como el etanol, vino, néctares, vinagres, jaleas etc. (Quimbita *et al.* 2013).

Por otro lado se sabe que en el área de fermentación del cacao y el área de cultivo están presente levaduras nativas (denominadas así ya que pertenecen a un área geográfica determinada), que dan inicio a la fermentación alcohólica. Estas levaduras están totalmente adaptadas al crecimiento en el exudado de cacao, al clima y condiciones drásticas. Estas levaduras dan tipicidad y originalidad a los posibles productos elaborados mediante la fermentación de exudado de cacao, originalidad que no se consigue al emplear las levaduras comerciales *S. cerevisiae* (Ortiz 2013).

El aislamiento de estas levaduras nativas permitirá que se cuente con microorganismos capaces de ser empleados en la fermentación del exudado de

cacao CCN-51 y así valorizar este residuo agroindustrial como sustrato para diferentes procesos biotecnológicos como la obtención de etanol, proteína celular y derivados alimentarios.

Es por ello que el presente trabajo de investigación tiene como objetivo aislar y seleccionar levaduras nativas en el distrito de San Alejandro, capaces de producir altos rendimientos de alcohol empleando como sustrato el exudado de cacao (*Theobroma cacao L.*) clon CCN-51.

La obtención de levaduras nativas procedentes del área de fermentación de cacao CCN-51 permite que se cuente con ceparios para futuras investigaciones relacionadas a la biotecnología. De esta manera poder aprovechar los residuos de la industria del cacao contribuyendo con el desarrollo de la economía de pequeños y medianos agricultores en la región Ucayali.

II. REVISIÓN DE LITERATURA.

2.1. ANTECEDENTES.

En la fase inicial consiste en la transformación de los azúcares del mucílago de cacao en alcohol etílico, que se lleva a cabo por las levaduras, pertenecientes a los géneros *Cándida*, *Dedaryomyces*, *Hansenulaa*, *Kloeckera*, *Pichia*, *Rhodotorula*, *Saccharomyces* y *Torulopsis*. Cuando el medio es rico en azúcar, su transformación en alcohol hace que, llegada una cierta concentración, las levaduras no puedan sobrevivir (Márquez y Salazar 2015).

En Ecuador se realizó una bebida alcohólica a base de exudado de cacao CCN- 51. La bebida alcohólica de mayor valor ponderado fue la elaborada con mosto corregido a 22 °Brix, fermentado con levadura del género *Saccharomyces Cerevisiae* y con el 50% de cascarillas irradiadas con una dosis UV-C de 23 kJ/m². El tiempo que duro la fermentación fue de 10 días, siendo el tratamiento 1 y 3 los que obtuvieron grados alcohólicos más elevados, de 13,9 y 14,9 °GL (grados Gay - Lussac) respectivamente, (Alarcon 2013).

En el trabajo de Goya (2013), en el proceso de fermentación de exudado de cacao, reporto que los análisis físico – químicos de la bebida alcohólica no presentaron diferencia estadísticas en el pH, °Brix y °GL. El menor pH fue el T1 con 4,10 y el mayor T11 de 4,56. En el parámetro de °Brix el menor fue el T9 con 9,00 y 10,17 para el T7 de mayor, la fermentación inicio con 22 °Brix. En la producción alcohólica el T12 obtuvo 15,15 °GL como máximo rendimiento y el rendimiento inferior fue el T1 de 8,76 °GL. Se presentó diferencia en el factor tiempo en relación al pH. Con 8 días de fermentación se obtuvo un menor pH 4,24, pero con 12 días el pH aumento ligeramente 4,42.

Según Villagómez y Argüerllo (2013), para la obtención de vinagre a partir de exudado de cacao CCN-51, realizaron la caracterización química del sustrato (alcohol a partir de exudado de cacao), estableciendo las condiciones óptimas para una fermentación acética, además reportan que el tiempo que mantuvieron la fermentación fue de 10 días, logrando consumir casi todos los °Brix, obteniendo 7,1 °GL en promedio.

En Ghana se realizaron trabajos de aislamiento y reconocimiento de levaduras en el proceso de fermentación de cacao. En la primera fase aparecen entre 5 y 6 especies diferentes de levaduras, que luego desaparecen dejando su lugar a *Hanseniaspora guilliermondii*, que es la levadura predominante durante las primeras 24 horas. A *Hanseniaspora* sólo se le encuentra ocasionalmente en las fases posteriores. Las levaduras *Candida zemplinina*, *Candida silvae*, *Candida zemplinina* y *Candida diversa* son levaduras que se encuentran comúnmente en las fermentaciones en charolas, posiblemente por la mayor concentración de oxígeno en ese tipo de fermentación. Se reporta que a las 36-38 horas dominan *Saccharomyces cerevisiae* y *Pichia membranaefaciens*, que se encuentra al final de la fermentación (Wacher 2011).

En las fermentaciones por pilas que se llevan a cabo en Ghana, *Pichia kudriavzevii*, *Saccharomyces cerevisiae* y *Hanseniaspora opuntiae* son los componentes principales de la comunidad de levaduras, *H. opuntiae* se desarrolla al principio de la fermentación, debido a su tolerancia a valores bajos de pH y a sus características metabólicas. Algunos de los cuales no se han reportado en otros ambientes o fueron aislados inicialmente del cacao. Este es el caso de nuevas levaduras como *Candida halmiae*, *Geotrichum ghanense*, *Candida awuiai* (Wacher 2011).

2.2. GENERALIDADES DEL CACAO CCN-51.

El cacao clon CCN-51 es originario de Ecuador. El creador del cacao CCN-51 fue el agrónomo Homero Castro Zurita, con la Colección Castro Naranjal 51. El científico ecuatoriano desarrolló en 1965 un clon de cacao de la doble hibridación de material genético Trinitario y Forastero de origen amazónico. Castro investigó desde 1952 las diversas variedades del grano y finalmente obtuvo la del tipo 51, que es tolerante a las enfermedades, de alta productividad y calidad (Alarcon 2013).

2.2.1. Clasificación taxonómica.

A continuación se detalla la clasificación taxonómica del cacao en el Cuadro 1.

Cuadro 1. Clasificación taxonómica del cacao.

Clasificación taxonómica	
Reino	Plantae
División	Magnoliophyta
Clase	Magnoliopsida
Familia	Sterculiaceae
Género	Theobroma
Especie	Theobroma cacao

Fuente: Goya (2013).

El árbol del cual procede el cacao, tiene apariencia extraña y, hace más de 200 años, Carolus Linnaeus lo llamó *Theobroma cacao*; que en griego significa cacao alimento de los dioses. La planta alcanza hasta 7 m de altura y produce frutos en forma de bayas fibrosas con 10 surcos, entre 15 y 25 cm de largo, de 7,5 a 10 cm de diámetro conteniendo entre 20 y 40 semilla. Cada una

de estas, por lo general, tienen 2,5 cm de longitud y está cubierta de una pulpa suave llamada mucilago. La mayor producción de una planta de cacao se inicia cuando tiene 4 ó 5 años y a mayor edad puede tener, en un año, hasta 6000 flores; pero sólo 20 mazorcas con frutos que maduran durante todo el año. Su recolección se realiza luego de cinco a seis meses de haber realizado su fertilización y por lo general, se realizan dos cosechas al año: la principal, que empieza al final de la estación lluviosa y continúa hasta el inicio de la estación seca y la intermedia, al inicio del siguiente periodo de lluvias (Loayza 2014).

2.2.2. Producción de cacao.

La producción de cacao en el Perú está distribuido en diferentes regiones teniendo presencia en Amazonas, Ayacucho, Cajamarca, Piura, Cusco, Huancavelica, Huánuco, Junín, Madre de Dios, Loreto, Ucayali y otros. La producción de cacao en el país está en constante crecimiento, por la acogida del producto en los mercados, en el cuadro 2 se presenta los datos de producción a nivel nacional y en la región de Ucayali (MINAGRI 2016).

Cuadro 2. Producción nacional y regional de cacao.

Nivel	Indicador	Unidad	2011	2012	2013	2014	2015
Nacional	Producción	t	56499	62492	71838	81651	87317
Nacional	Rendimiento	Kg/Ha	671	683	736	766	-
Ucayali	Superficie cosechada	Ha	1854	2968	3255	3351	-
Ucayali	Producción	t	1598	2568	2888	2905	6704
Ucayali	Rendimiento	Kg/Ha	862	865	887	867	-
Ucayali	Precio en chacra	Soles/Kg	5,78	4,45	4,46	5,07	5,26

Fuente: INEI - Sistema de Información Regional para la Toma de Decisiones (2017).

2.3. EXUDADO DE CACAO CCN-51.

Las semillas de cacao están rodeadas por una pulpa aromática la cual procede de sus tegumentos. La pulpa mucilaginosa está compuesta por células esponjosas parenquimatosas, que contienen células de savia ricas en azúcares (10-13%), pentosas (2-3%), ácido cítrico (1-2%), y sales. Durante el proceso de cosecha de las semillas de cacao (el producto de exportación), la pulpa es removida por fermentación e hidrolizada por microorganismos. La pulpa es conocida en la industria como "exudado". Durante la fermentación la pulpa provee el sustrato para varios microorganismos que son esenciales para el desarrollo de los precursores del sabor del chocolate, los cuales son expresados completamente después, durante el proceso de tostado. Aunque la pulpa es necesaria para la fermentación, a menudo hay más pulpa de la necesaria este exceso de pulpa tiene un delicioso sabor tropical (Alarcon 2013).

La pulpa fresca de cacao está compuesta por el 80% de agua, de 10 al 15% de glucosa y fructosa, hasta el 0,5% de ácidos no volátiles, en su mayor parte cítricos y cantidades pequeñas de almidón, ácidos volátiles y sales. En un principio la pulpa es estéril, pero la presencia de azúcar y la adecuada acidez (pH 3,5), proporcionan excelentes condiciones para el desarrollo de microorganismos, una vez que la mazorca se abre (Márquez y Salazar 2015).

La pulpa puede ser consumida fresca en forma de jugos o batidos. Además, la pulpa se puede preservar por congelación y ser utilizada para dar sabor a helados y yogures (Alarcon 2013).

2.3.1. Composición química del exudado de cacao CCN-51.

La composición química del exudado de cacao cuenta con los componentes necesarios para el desarrollo de microorganismos (Alarcon 2013).

En el cuadro 3 se presenta la composición del exudado de cacao CCN-51, se observa la presencia de los principales nutrientes.

Cuadro 3. Constituyentes del exudado de cacao CCN-51.

Componentes	Porcentaje en base húmeda (%)
Agua	79,20 – 84,20
Proteína cruda	0,09 – 0,11
Azúcares	12,50 – 15,90
Glucosa	11,60 – 15,32
Sacarosa	0,11 – 0,90
Pectinas	0,90 – 1,19
Ácido cítrico	0,77 – 1,52
Cenizas	0,40 – 0,50

Fuente: Barén (2013).

Aproximadamente 40 litros de pulpa se pueden obtener de 800 Kg de semillas frescas (Alarcon 2013).

2.4. LEVADURAS.

2.4.1. Definición.

Las levaduras son hongos unicelulares eucariotidos pertenecientes al reino *Fungi* (la mayoría pertenecientes a las clases *Ascomycete*, *Basidiomycete*), se dividen asexualmente por gemación o fisión binaria y el tamaño de una célula individual varía de 2 a 3 μm y de 20 a 50 μm de largo y de ancho de 1 a 10 μm (Ortiz 2013).

2.4.2. Clasificación.

Las levaduras son un grupo diverso filogenéticamente de hongos, Sus estados sexuales (telemorfos) pueden ser clasificados principalmente en

dos clases, los Ascomycetes y los Basidiomycetes. A continuación se muestran las familias de relevancia enológica (Ortiz 2013).

Ascomicetos.

Familia: *Schizosaccharomycetaceae*.

Género: *Schizosaccharomyces*.

Familia: *Metschnikowiaceae*.

Género: *Metschnikowia*.

Familia: *Saccharomycetaceae*.

Géneros: *Saccharomyces*, *Debaryomyces*, *Dekkera*, *Kluyveromyces*, *Pichia*, *Zygosaccharomyces* y *Torulaspora*.

Familia: *Saccharomycodaceae*.

Género: *Hanseniaspora* y *Saccharomyces*.

Familia: *Candidaceae*.

Género: *Brettanomyces*, *Candida* y *Kloeckera*.

Basidiomicetos.

Familia: *Sporobolomycetaceae*.

Género: *Rhodotorula*.

Familia: *Cryptococcaceae*.

Género: *Cryptococcus*.

2.4.3. Características generales.

La estructura de una levadura es la de una típica célula eucariota, su morfología es característica de cada especie, la levadura típica tiene forma ovoide, sin embargo podemos encontrar alargadas, esféricas, de forma de pera o de limón o incluso triangulares. En un cultivo puro se puede observar que existe

variación en el tamaño y forma de las células, estas diferencias dependerán de la edad del cultivo y del medio donde se encuentren. No poseen flagelos ni otro órgano de locomoción y algunas pueden presentar un material viscoso, compuesto de polisacáridos, que rodea la célula (Ortiz 2013).

Las levaduras son capaces de crecer como anaerobios facultativos, si disponen de oxígeno las levaduras realizan una respiración aeróbica para metabolizar los azúcares hasta dióxido de carbono y agua, si carecen de oxígeno fermentan azúcares produciendo etanol y dióxido de carbono. El rango de tolerancia de pH que tienen las levaduras va desde 2 hasta 8, Crecen generalmente a temperaturas en un rango de 0 a 50 ° C, sin embargo la mayoría tiene temperaturas óptimas de crecimiento entre los 20 y 30°C. Pueden desarrollarse en medios con concentraciones relativamente altas de solutos, además existe un grupo de levaduras que tolera cantidades de soluto aún mayores, por lo que se denominan osmófilas (Ortiz 2013).

2.4.4. *Saccharomyces cerevisiae*.

Es la especie de levaduras utilizada por excelencia para la obtención de etanol a nivel industrial puesto que es un microorganismo de fácil manipulación y recuperación, no es exigente en cuanto a su cultivo, no presenta alto costo , tolera altas concentraciones de etanol , en la fermentación produce bajos niveles de subproductos, es osmotolerante, capaz de utilizar altas concentraciones de azúcares, presenta alta viabilidad celular para el reciclado y características de floculación y sedimentación para el procesamiento posterior (Garzón y Hernández 2009).

Saccharomyces cerevisiae es una levadura cuya colonia es de color crema o blanco, apariencia húmeda y brillante de bordes irregulares. La

temperatura óptima de crecimiento es de 25 a 30 °C. Puede producir ascosporas cuando hay requerimientos nutricionales adecuados (Garzón y Hernández 2009).

Sus dimensiones son: 2,5-10 µm de ancho y 4,5-21 µm de largo, Microscópicamente se observan redondas y ovoides, elipsoides a veces cilíndricas y filamentosas. Fermenta glucosa, galactosa, sacarosa y maltosa y no fermenta la lactosa. Asimila galactosa, sacarosa, maltosa y rafinosa. La aireación óptima es de 0,6-0,9vvm (Garzón y Hernández 2009).

El nombre de *Saccharomyces* significa azúcar de hongos. Producen una fermentación vigorosa y es conocida como la levadura de la cerveza, sirve como fuente de enzimas (invertasa), como extracto de levadura autolisado para sustituir los sabores naturales del extracto de carne, hace fermentar la masa del pan, interviene en la fabricación del vino y como fuente de proteína, vacunas, ácidos grasos y aceites (Fajardo y Sarmiento 2007).

Saccharomyces pertenece al género de las levaduras de la familia *Saccharomycetaceae*; las células son esferoidales, elipsoidales o cilíndricas. La reproducción vegetativa ocurre por mecanismos multilaterales: Los pseudomicelios pueden ser formados por algunas especies, pero presenta ausencia de hifas verdaderas. En presencia del O₂ pueden metabolizar sustratos como glicerol, etanol y lactato (Fajardo y Sarmiento 2007).

2.4.4.1. Requerimientos nutricionales.

La *Saccharomyces cerevisiae* requiere ciertos nutrientes y condiciones ambientales para su apropiado crecimiento y reproducción. Algunos elementos son básicamente necesarios como por ejemplo carbono, hidrogeno, oxigeno, nitrógeno y fosforo (Fajardo y Sarmiento 2007). El carbono sirve como fuente de energía y como material constitutivo de la masa celular. El

nitrógeno se encuentra en la célula formando parte esencial de las proteínas, aminoácidos y ácidos nucleicos; el fosforo se encuentra en los ácidos nucleicos, en la lecitina y en diversos compuestos fosforilados que participan activamente en los procesos de degradación oxidativa y de intercambio energético (ATP, ADP, AMP, NADP). Para que la fuentes de nitrógeno, fosforo y carbono presentes en el sustrato sean aprovechados por la levadura se requiere que se encuentren en forma asimilable (Fajardo y Sarmiento 2007).

2.4.4.2. Requerimientos físico-químicos.

El crecimiento de *S. cerevisiae* se ve favorecido por un pH 4,0 – 5,0 y no se desarrollan en medio alcalino a menos que se hayan adaptado al mismo. A pesar de la tolerancia bastante amplia de esta levadura para las variaciones de pH a partir de los sustratos habitualmente usados en los medios de cultivo forman productos en especial ácidos que influyen en el crecimiento celular, producción enzimática y utilización de glucosa. Así por ejemplo, algunas investigaciones han observado que con un pH inicial del medio a valores entre 4,0 y 4,5 se obtiene mejor crecimiento y utilización de glucosa, mientras que la máxima producción de enzima se da a un pH de 3,0 (Fajardo y Sarmiento 2007).

2.4.4.3. Composición química.

Las levaduras contienen un 75% de agua y un 25% de materia seca aproximadamente (Fajardo y Sarmiento 2007).

Cuadro 4. Composición química de las levaduras.

Componentes	Porcentaje (%)
Ceniza	7
Carbohidratos	43
Proteína	48
Grasa	2

Fuente: Fajardo y Sarmiento (2007) .

Las sustancias minerales de las levaduras representan por lo general un 5-9% del peso seco. Los componentes principales son ácido fosfórico, alrededor del 50% y potasio del 30%. Las sustancias nitrogenadas de la levadura representan unas dos terceras partes de su peso seco (30 – 75%), contienen entre 5 y 12% de Nitrógeno. Estas sustancias se reparten en un 64% de proteína, 10% de peptonas y aminoácidos, 8% de amonio, 10% de purina y el resto consiste en pirimidinas y vitaminas. El contenido normal de aminoácidos depende de la alimentación, de la cantidad de oxígeno, de la temperatura del cultivo, etc. (Fajardo y Sarmiento 2007).

2.4.5. Levaduras nativas.

Son cepas de levaduras que procedan de la zona vitivinícola (o área geográfica en el cual se obtiene el sustrato a fermentar) donde se van a utilizar, se conoce como levaduras locales seleccionadas (Ortiz 2013).

2.4.6. Importancia.

El uso de las levaduras nativas es más efectivo que las levaduras comerciales para realizar fermentaciones ya que se cree que las levaduras que se encuentran en una microzona son específicas del área, están totalmente adaptadas a las condiciones climáticas de la zona, a la materia prima, y son

responsables parcialmente de las características únicas de los vinos obtenidos. Por lo que las características propias de una zona, como mostos con alto o bajo contenido en azúcares, grado alcohólico, tipo de vinos elaborados, temperatura de fermentación, etc., pueden ser entre otros, aspectos interesantes para la selección de levaduras. La importancia de estos parámetros puede ser relativa dependiendo del producto para el cual quieren ser utilizados (Ortiz 2013).

2.5. AISLAMIENTO DE LEVADURAS.

Es el conjunto de técnicas microbiológicas de laboratorio para la obtención de cepas de levaduras en el laboratorio (Schlegel 1997).

2.5.1. Cepa.

Se denomina cepa a un conjunto de microorganismos que son clones de una sola célula (Schlegel 1997).

2.5.2. La esterilización de los materiales.

La destrucción de microorganismo es la base de los métodos de trabajo microbiológicos y de la conservación de los alimentos; se denomina esterilización a la liberación de un material de microorganismos vivos o en estado latente (Schlegel 1997).

2.5.3. Calor húmedo.

Las células vegetativas de las bacterias y hongos ya son destruidas a temperaturas de alrededor de 60°C (5-10 minutos), las esporas de las levaduras y de los hongos solo por encima de 80°C y las esporas de las bacterias por encima de 120°C (15 minutos). El tiempo que se necesita que actúe el calor

húmedo para destruir las esporas de algunas especies bacterianas representativas, extraordinariamente resistentes al calor puede calcularse a partir de los tiempos de reducción decimal (D_{10}). Para alcanzar temperaturas superiores al punto de ebullición del agua se utiliza el autoclave (Schlegel 1997).

2.5.4. Calor seco.

Si se someten a calor seco las esporas de las bacterias solo son destruidas a temperaturas más altas y con tiempos de acción más prolongados que si se las somete a calor húmedo. Por eso el material de vidrio, los polvos y aceites insensibles al calor son esterilizados manteniéndolos 2 horas en un horno con calor seco a 160°C. En el caso de materiales de alta capacidad calorífica o con propiedades de aislamiento térmico tiene que considerarse el tiempo de calentamiento. No obstante, en todos los casos se recomienda un control de temperatura (por medio de indicadores) o un control de esterilidad. Si el material lo permite, actualmente se calientan 30 minutos a 180°C. La experiencia demuestra que así se eliminan todas las esporas. La destrucción por el calor se debe a la coagulación de proteínas celulares (Schlegel 1997).

2.6. CÁMARA NEUBAUER.

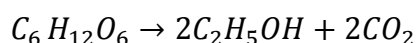
El método más extendido para la determinación del número total de células se basa en el conteo al microscopio de las células extendidas en una capa delgada en una cámara de conteo (Schlegel 1997). Se trata de una gruesa placa de cristal con forma de portaobjetos, de unos 30 x 70 mm y unos 4 mm de grosor. En el caso de cámaras dobles, que son las más comunes, existen 2 zonas de conteo, una superior y otra inferior al eje longitudinal de la cámara. La

retícula completa mide 3 mm x 3 mm de lado, Subdividida a su vez en 9 cuadrados de 1mm de lado cada uno (Bastidas s.f).

2.7. FERMENTACIÓN ALCOHÓLICA.

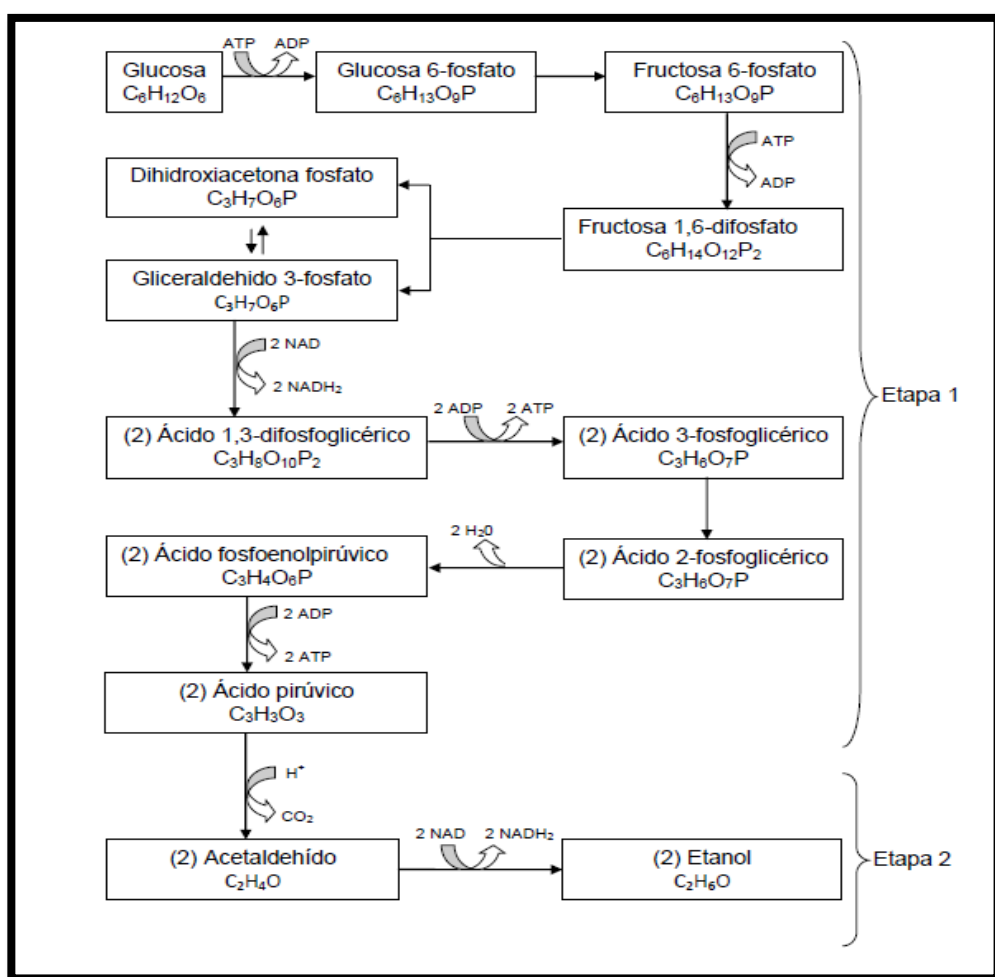
Es la conversión de glucosa y fructosa en etanol y dióxido de carbono como metabolitos principales por acción de las levaduras. El desarrollo de la fermentación alcohólica está ligado a la fase de crecimiento de las levaduras (Ortiz 2013).

Al inicio de la fermentación, la levadura comienza su proceso de reproducción, El desarrollo de esta etapa depende de la disponibilidad de oxígeno, fuentes de nitrógeno y de algunos otros nutrientes. Cuando el oxígeno es consumido la reproducción celular se detiene y comienza el proceso anaerobio en el que la glucosa se transforma en etanol y CO₂ (Sánchez 2011). El balance global de la fermentación se representa mediante la siguiente ecuación química (Sánchez 2011):



A pesar de la simplicidad de esta ecuación, la secuencia de transformaciones para degradar a una molécula de glucosa hasta dos moléculas de etanol y dos moléculas de dióxido de carbono es un proceso complejo que involucra 2 etapas: (1) la formación en anaerobiosis de 2 moléculas de piruvato a través de la ruta metabólica de Embden-Meyerhof (glucólisis) y (2) la descarboxilación del piruvato en anaerobiosis para dar lugar a dos moléculas de acetaldehído que se reducen a etanol (Sánchez 2011).

Un sistema fermentativo se define como el volumen de reacción limitado por un contenedor físico (biorreactor). Donde se lleva a cabo la degradación biológica anaerobia de moléculas orgánicas mediante la acción de ciertas enzimas que actúan directamente o como componentes de ciertas bacterias y levaduras. El biorreactor más simple es el matraz erlenmeyer (Sánchez 2011).



Fuente: Sanchez (2011).

Figura 1: Seguimiento de reacciones para obtener etanol a partir de glucosa.

La velocidad de fermentación, expresada como cantidad de azúcar transformado en unidad de tiempo, es muy variable al depender de una gran cantidad de factores, no obstante la velocidad de desprendimiento de anhídrido

carbónico oscila entre 0,4 a 2,8 g/l.h, que corresponde a una velocidad de consumo de azúcar de 0,9 a 6,0 g/l.h. La temperatura es uno de los factores que más influyen en la cinética de las fermentaciones, siendo más activa cuando ésta es más elevada y hasta el límite vital de las levaduras. Una temperatura alta al principio de la fermentación, aumenta efectivamente la velocidad fermentativa, pero puede conducir a una parada de la fermentación hacia el final de la misma. La temperatura es un parámetro en la fermentación, debe estar alrededor de 26 °C y 18 °C para vino tinto y blanco respectivamente (Ortiz 2013).

2.8. LA CAMELIZACIÓN DE SOLUCIONES AZUCARADAS.

Denominada, también pirólisis, la caramelización se presenta al sufrir los azúcares un calentamiento. Cuando se trata de disacáridos, existe una hidrólisis previa que produce los correspondientes monosacáridos y estos se transforman en enoles, siguiendo el proceso aparece una deshidratación del enol que produce derivados furánicos que se polimerizan finalmente dando lugar a pigmentos macromoleculares oscuros. Aparentemente, este proceso sigue dos posibles vías de degradación que depende directamente del pH del sistema (Díaz y Clotet 1995).

El inicio de la caramelización en medio ácido es provocado por la formación de 1,2-enol del grupo aldéhidico o cetona seguido de unos pasos intermedios que producen 2-furfural en el caso de las pentosas, o bien 5-hidroximetil-2-furfural en hexosas. Posterior a esta formación se produce una polimerización de estas sustancias, dando lugar a pigmentaciones oscuras. La formación del 1,2-enol es también el primer paso de la caramelización en medio básico al que sigue una isomerización del tipo Lobry de Bruyn. A este paso le sigue una fragmentación de los productos resultantes en compuestos de tres

carbonos. La producción de pigmentos engloba reacciones de condensación y polimerización entre los grupos intermedios (Díaz y Clotet 1995).

La caramelización de la sacarosa se ha estudiado con más detalle y se ha comprobado que al calentarse a más de 160°C se provoca simultáneamente la hidrólisis, la deshidratación y la dimerización de los productos resultantes; se sintetiza la isosacarosana de sabor amargo; al incrementar la temperatura se acelera la deshidratación y se produce la caramelana ($C_{24}H_{36}O_{18}$), que corresponde a dos sacarosas eliminadas de 4 H_2O . Posteriormente se sintetiza el carameleno, $C_{36}H_{50}O_{25}$ sustancia oscura y amarga, que representa tres residuos del azúcar menos ocho moléculas de agua. Un calentamiento excesivo da origen a la caramelina o humina de peso molecular muy alto ($C_{125}H_{188}O_{80}$) y sabor desagradable (Delgadillo s.f.).

Al someter los azúcares en estado cristalino o como jarabes a temperaturas superiores a su punto de fusión se generan una serie de reacciones complejas en las cuales se da un rompimiento de las moléculas de azúcares, los residuos de éstos azúcares se reagrupan y forman moléculas diferentes que pueden ser de bajo o alto peso molecular dependiendo que tanto se unen nuevamente éstos compuestos. Los pigmentos son las melanoidinas similares a las desarrolladas por las reacciones de Maillard, pero con diferentes mecanismos de formación. Cuando un azúcar es calentado y fundido, no solamente aparece el color caramelo, sino que paralelamente se forman otros compuestos que colaboran en el sabor y aroma de los productos, como el caso del isomantol y mantol, que caracterizan el olor del pan horneado (Delgadillo s.f.)

III.MATERIALES Y MÉTODOS.

3.1. UBICACIÓN DEL ESTUDIO.

La presente investigación se realizó en las instalaciones del caserío San Juan Bautista C.F.B. Km 130 y de la Universidad Nacional de Ucayali, desarrollada en dos etapas.

3.1.1. Trabajo de campo.

En el caserío San Juan Bautista de las parcelas de cacao CCN-51 del Sr. Dante Pizarro a 3 km margen izquierda de la C.F.B. Km 130, distrito de San Alejandro Ucayali. Se realizaron dos visitas, en la primera se recogieron muestras procedentes del área de fermentación para realizar el aislamiento de levaduras nativas. En una segunda visita se tomó muestra de exudado de cacao CCN-51 para la fermentación alcohólica y realiza el análisis químico proximal.

3.1.2. Trabajo de laboratorio.

En el laboratorio de Microbiología y Parasitología de la Facultad de Ciencias de la salud escuela profesional de enfermería se realizó el aislamiento de levaduras, la selección de levaduras y la fermentación de exudado del cacao CCN-51. En el laboratorio de Suelos de la Facultad de Ciencias Agropecuarias se realizó la destilación y medición °GL (Gay Lussac).

3.2. MATERIALES.

Para el trabajo de investigación se usaron los siguientes materiales:

- Bolsas de polipropileno, envases de vidrio con tapa.
- Matraces de 1L, 500 ml, 250 ml y 125 ml.

- Placas Petri.
- Pipetas de 10 ml, 5 ml y 2 ml.
- Buretas.
- vasos precipitados de 100 ml, 250 ml, 500 ml y 1 litro.
- Botellas pirexs de 1L y 500 ml.
- Corchos.
- Tiras de jebes de 10mm de ancho y 2 mm de espesor.
- Papel toalla.
- Parfilm.
- Papel Kraft.
- Mechero bunsen.
- Mechero de alcohol.
- Olla pequeña.

3.3. INSUMOS.

Para el trabajo de investigación se usaron los siguientes insumos:

- Exudado de cacao CCN-51.
- Levadura seca comercial “Mauripan” (*Saccharomyces Cerevisea*).
- Papa blanca.

3.4. EQUIPOS.

Para el trabajo de investigación se usaron los siguientes equipos:

- Autoclave electric pressure steam sterilizer model No.25X.
- Refractómetro digital Hanna HI96801.
- Estufa eléctrica Memmert typ: VNB 200.
- Estufa eléctrica Digisystem.
- Incubadora eléctrica Memmert typ: INE 400.
- Microscopio óptico Boeco Germany Model NL CD – 120.
- Microscopio óptico Leica DM500.
- Balanza analítica Ohaus.
- Balanza micromle Scout™ Pro, 200 g.
- Cocina eléctrica Ofinezza®.
- Micropipetas.
- Potenciómetro.
- Equipo de destilación simple.
- Alcoholímetro Gay – Lussac.
- Termómetro.
- Refrigeradora Mabe.

3.5. REACTIVOS.

Para el trabajo de investigación se usaron los siguientes reactivos:

- Agar agar.
- Extrato de levadura.
- Peptona bacterial.
- Destrosa.
- Lugol gram.
- NaOH 10% v/v.

- Etanol 96%.
- HCl 10% v/v.
- Cloranfenicol.
- Tween 80 al 0,1%.

3.6. METODOLOGÍA.

La metodología usada para el desarrollo el presente trabajo de investigación se representa en forma resumida en la siguiente figura.

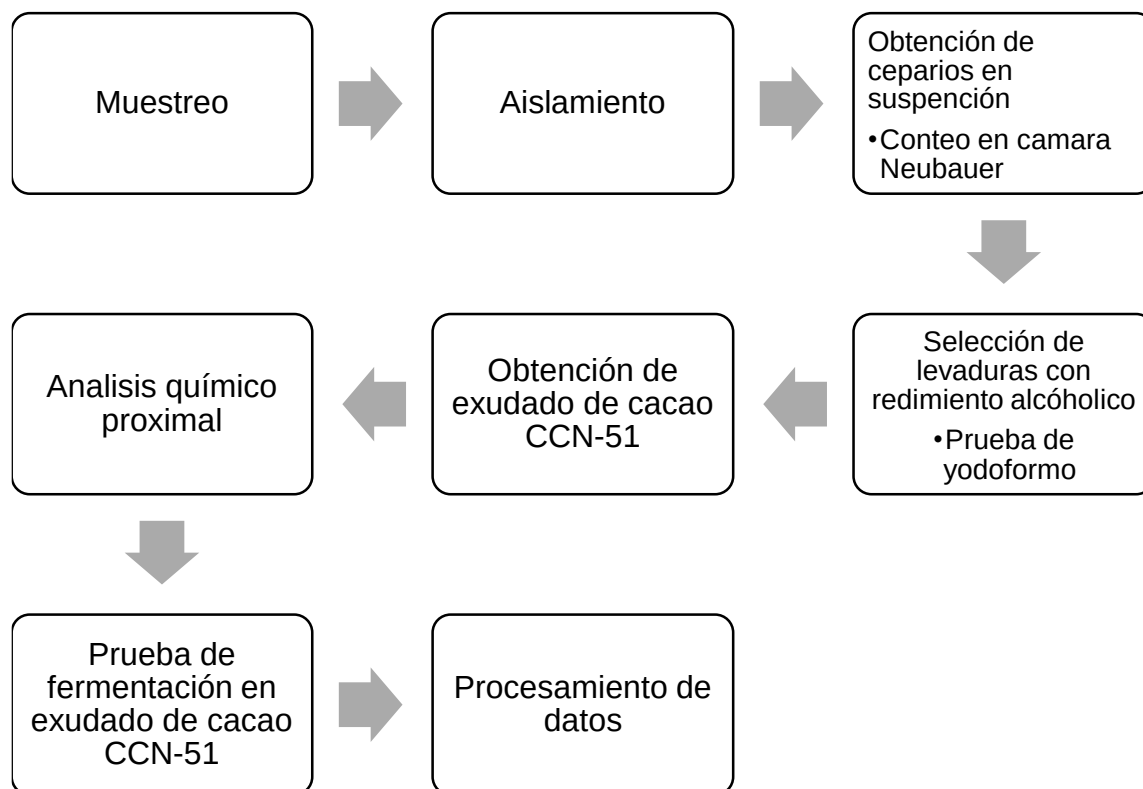


Figura 2. Etapas de la ejecución del proyecto de investigación.

3.6.1. Toma de muestras.

Las muestras se obtuvieron del caserío San Juan Bautista C.F.B. Km 130, distrito de San Alejandro de las parcelas de cacao CCN-51 del Sr. Dante Pizarro ubicado a 3 km margen izquierda de la C.F.B. en este fundo se cuenta

con un área específica para la fermentación del cacao, empleando para ello un cajón de madera donde se acumulan las semillas.

Se llevaron envases de vidrio y bolsas estériles para el recojo de muestras. Se tomó muestras al azar de tierra que se encuentra en la parte inferior del cajón fermentador, en donde se derrama el exudado de cacao, se tomó muestras de hojas secas que tuvieron contacto con exudado de cacao, cáscaras de cacao que aun contenían mucilago y por último el exudado de cacao propiamente dicho. Las muestras del exudado de cacao CCN – 51, se obtuvieron de la misma área de fermentación, directamente del cajón durante el primer día de fermentación, se recogieron 18 L aproximadamente. Este exudado se pasteurizo y se refrigero, Otro volumen de 2 L se congelo para su posterior análisis químico proximal.

3.6.2. Preparación de muestras.

A partir de esta etapa y hasta la conclusión del trabajo de investigación se tuvo un manejo de asepsia de todas las muestras, soluciones, medios de cultivos, caldos nutritivos, materiales de laboratorio (matraz, pipetas, etc.), mandil, cofia, mascarillas y otros utilizando métodos de esterilización como el autoclavado (calor húmedo), esterilización en estufa eléctrica (calor seco) y métodos químicos empleando detergentes y etanol para la desinfección de las mesas. La generación de espacios estériles en el laboratorio se logró empleando mecheros.

Las muestras obtenidas se prepararon para su correspondiente proceso de aislamiento:

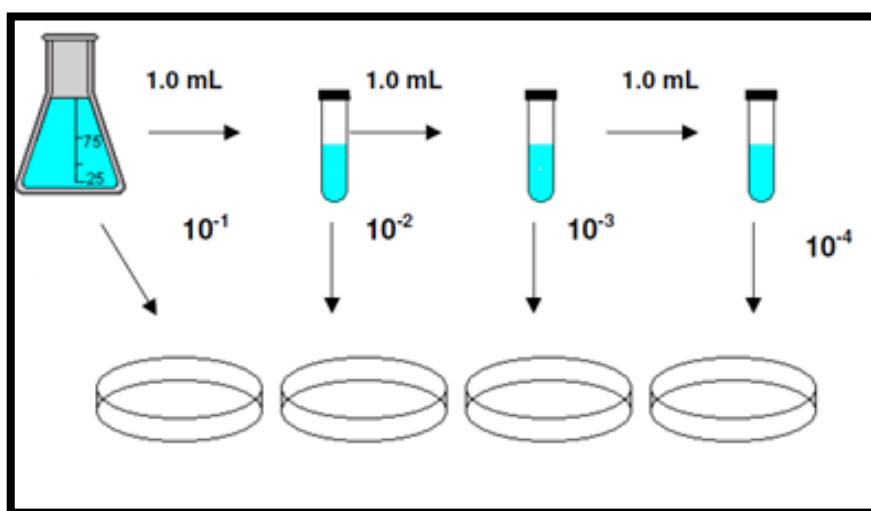
- **La muestra de tierra:** Se pesó 10 g de la muestra, este se depositó en un matraz de 250 ml que contenía 90 ml de

solución salina (NaCl) al 7,5% estéril, esta suspensión se homogenizo obteniendo la muestra preparada.

- **La muestra de cáscara de cacao:** Se realizó un lavado de la muestra con 100 ml de solución salina (NaCl) al 7,5%, en un vaso precipitado de 250 ml, en donde se colocaba la porción de cáscara y se procedía a agitarlo, así se obtuvo una muestra líquida preparada que contenía los microorganismo que se pretendía aislar.
- **La muestra de hojas:** Se realizó un lavado de la muestra con 100 ml de solución salina (NaCl) al 7,5%, en un vaso precipitado de 250 ml, en donde se colocaba una porción de las hojas y se procedía a agitarlo, así se obtuvo la muestra líquida preparada que contenía los microorganismo que se pretendía aislar.
- **La muestra de exudado:** Se tomó 10 ml de la muestra de exudado y se depositó en un matraz de 250 ml que contenía 90 ml de una solución salina (NaCl) al 7,5%, obteniendo la muestra preparada.

Una vez obtenidas las muestras se realizaron las diluciones seriadas hasta la dilución de 10^{-4} . Para realizar las diluciones seriadas se preparó 4 tubos con 9 ml de solución salina estéril (NaCl) al 7,5% por muestra preparada, es decir que un total de 16 tubos. Se tomó 1 ml de la muestra de tierra preparada empleando pipetas de 10 ml en condiciones aséptica, este se deposita en el primer tubo (10^{-1}) que contenía 9 ml de solución salina y se agito el tubo, se tomó 1 ml de solución del primer tubo para luego depositarlo en el

segundo tubo (10^{-2}) que contenía 9 ml de solución salina y se agito, se tomó 1 ml de solución del segundo tubo para luego depositarlo en el tercer tubo (10^{-3}) que se agito para luego finalmente tomar 1 ml de solución del tercer tubo y depositarlo en el cuarto tubo (10^{-4}) (Camacho *et al.* 2009). Lo descrito anteriormente se realizó para las tres muestras preparadas restantes, obteniéndose muestras en tubos que estaban en diluciones de 10^{-1} a 10^{-4} , (16 tubos en total, 4 tubos por muestra). La figura 5 presenta una representación figura de lo descrito.



Fuente: Fajardo y Sarmiento (2007).

Figura 3. Dilución seriada de muestras para siembra.

Cada tubo con dilución será usado para la siembra por estrías en placas Petri en medio selectivo.

3.6.3. Siembra de microorganismos.

Para esta etapa se prepararon placas Petri con medio selectivo Yeast Extract-Peptone-Destrose YPD (Ver Anexo 3). Solidificado el medio YPD en las placas se empleó un asa de siembra bacterial para recoger una “asada” de los tubos en donde se realizó las diluciones seriadas (10^{-1} a 10^{-4} para cada

muestra), por el método de estriado (ver anexo 2) se realizó la siembra sobre el medio, por cada tubo de dilución una placa, luego se envolvió las placas Petri con parafilm para llevarlas a la incubadora a 37,5°C, se examinó el crecimiento de los microorganismos durante el tiempo que tardó el desarrollo de las colonias. El crecimiento de los microorganismos se realizó a condiciones aerobias, a un pH de 4,5 valor que se encuentra en el rango adecuado para el crecimiento de levaduras y la inhibición del crecimiento de bacterias (Garzón y Hernández 2009).

3.6.4. Aislamiento y obtención de cepas.

Las diferentes levaduras que crecieron en las placas Petri con medio YPD fueron resembradas de forma individual en placas con Papa Destroza Agar (PDA) (ver elaboración de medio en anexo 4) incubadas a 37,5 °C, de esta forma se obtuvieron placas con un solo tipo de colonia en crecimiento. Se continuó con el proceso de aislamiento. Se preparó caldo YPD (procedimiento de elaboración igual al medio YPD sin uso de agar) en matraces de 250 ml (100 ml para cada matraz), a cada matraz se inoculó un tipo de levadura aislada. El sistema de inoculación consistió en utilizar el aza de siembra para hongos y tomar una pequeña porción de cuerpo celular de los microorganismos purificados procedentes de las placas con PDA se puso a incubar durante 24 horas a 37,5 °C, así se obtuvo muestras líquidas de las levaduras aisladas. Estas muestras fueron sometidas a un proceso de segundo aislamiento (segunda corrida) para la obtención de cultivos puros (cepas).

Las muestras de caldo YPD fueron diluidas en concentraciones de un rango de 10^{-1} a 10^{-4} células/ml para luego ser resembradas en medio YPD por técnica de estriado y esas nuevas placas se puso a incubar durante 3 días a

37,5 °C, con las diferentes colonias ya desarrolladas se aisló en medio PDA para su propagación y obtención de las cepas.

Con las nuevas colonias purificadas procedentes del segundo aislamiento se resembraron en tubos de 10 ml con medio solido PDA. Así se obtuvieron los ceparios de las diferentes levaduras nativas aisladas.

3.6.5. Obtención de levaduras en suspensión.

Se utilizó caldo YPD estéril, se depositó en matraces de 250 ml un volumen de 100 ml, se inocularon en 2 matraces por cada levadura aislada. Lo matraces inoculados fueron puestos a incubación a 37,5 °C en condiciones aerobias, se observó el crecimiento de los microorganismos durante 24 horas que tardo su crecimiento.

3.6.6. Determinación de concentración celular.

Se evaluó el crecimiento celular empleando la cámara Neubauer improved (ver anexo 5), esta metodología permitió determinar la concentración celular a partir del conteo de levadura en una placa especialmente diseñada, para el conteo fue necesario diluir las muestras a contar (una dilución de 10^{-1}) con Tween 80 al 0,1%, se determinó la concentración en células/ml aplicando la siguiente formula (GAB Sistemática Analítica S.L. s.f.):

$$\frac{X \text{ levaduras}}{Y \text{ cuadros}} * \frac{\# \text{ cuadros cámara}}{\text{Volumen de cámara}} * \frac{1000 \text{ mm}^3}{1 \text{ cm}^3 (\text{o } 1 \text{ mL})} = X \text{ millones de levaduras/mL}$$

$$\text{Volumen de cámara Neubauer improved} = 0,1 \text{ mm}^3$$

Con las concentraciones celulares aproximados a los rangos adecuado ($>10^7$) para estandarizar los inóculos (caldo YPD con levaduras en

crecimiento) a una concentración entre 10^6 a 10^8 células/ml adecuadas para las siguientes etapas del estudio.

También en esta etapa se pudo realizar la microscopia de las levaduras aisladas, para así obtener una mejor caracterización y reconocerlas parcialmente.

3.6.7. Estandarización de concentración de las cepas.

Para la dilución de las levaduras y llevarlas a la concentración deseada (10^6 a 10^8 células/ml) se utilizó agua destilada estéril, tips de micropipetas y pipetas. La dilución se realizó en matraces o tubos según sea el caso de cada tipo de levadura (algunas necesitaban mayores volúmenes de agua), para calcular la cantidad de agua a agregar se empleó la siguiente formula (Madigan *et al.* 2009):

$$C_1 * V_1 = C_2 * (V_{agua} + V_1)$$

Donde:

C₁: Concentración inicial de levadura en células/ml.

V₁: Volumen de muestra a diluir en ml.

C₂: Concentración deseada (10^6 - 10^8) células/ml.

V_{agua}: Volumen de agua necesaria para obtener la concentración deseada en ml.

El **V₁** tuvo un valor de 1 ml para realizar los cálculos, así se obtuvo los inóculos de levaduras para las siguientes etapas del estudio.

3.6.8. Fermentación de caldo YPD.

Consistió en realizar fermentaciones con todas las levaduras aisladas, para ello se utilizó como sustrato de la fermentación caldo YPD, las condiciones de fermentación se muestran en el cuadro 5:

Cuadro 5. Parámetros de fermentación de caldo YPD.

Cepa	Fermentador	Volumen de caldo YPD	Inóculo
Levadura aislada	Matraz de 125 ml	93,75 ml	1,4 ml (concentración de 10^7 células/ml)

Se inóculo con una proporción del 1,5% del volumen total de sustrato a fermentar, se realizó 3 repeticiones. Se puso a fermentar durante un tiempo de 72 horas y a temperatura ambiente, se observó los cambios y al concluir la fermentación se ejecutó la prueba de selección de levaduras que son capaces de producir alcohol empleando el método de yodoformo.

3.6.9. Selección de cepas por prueba de yodoformo.

Pasado las 72 horas de fermentación del caldo YPD, se procedió a tomar alícuotas de cada matraz, un volumen de 2,5 ml de caldo fermentado y se depositaron en tubos de 10 ml, a cada tubo se agregó 2 ml de NaOH 10% m/v y para finalizar se agregó 3 ml de lugol gram ($K_2I - I_2$). El tubo fue llevado a baño maría por más de 5 minutos a 60 °C agregando más lugol gram si fuera necesario. De esta forma se observó la formación de precipitado que indicaba la presencia de alcohol en el medio fermentativo (Vanegas y Zapata 2009).

Como se realizó una selección cualitativa fue necesario realizar pruebas con blancos, para esto se utilizó caldo nutritivo YPD con etanol a

concentraciones de 1:99, 1:9 y 1:1 respectivamente. Se comparó su reacción con los caldos fermentados, para así construir una tabla, en esta se codificaba 4 símbolos “+” para una semejanza a un blanco de 1:1, se codificaba con 2 símbolos “+” para una semejanza a un blanco de 1:9, se codificaba con 1 símbolo “+” para una semejanza a un blanco de 1:99 y cuando no se presenta precipitado se codificaba con 1 símbolo “-”. Esto permitió realizar la selección de las levaduras nativas que produjeron alcohol (Vanegas y Zapata 2009).

3.6.10. Fermentación de exudado de cacao CCN-51.

3.6.10.1. Acondicionamiento de exudado.

El día que se obtuvo el exudado procedente del área de fermentación de cacao CCN-51 de las parcelas del Sr. Pizarro se procedió a una pasteurización a 80 °C durante un tiempo de 10 minutos. Al segundo día con el exudado en la Universidad Nacional de Ucayali se procedió a realizar la esterilización del exudado utilizando un autoclave a las siguientes condiciones: 15 psi o 1 Kg/ cm² de presión, a 250 °F y 15 minutos.

3.6.10.2. Medición de °Brix y pH.

La medición de pH consistió en tomar 20 ml de exudado en un vaso precipitado de 200 ml y luego colocar el electrodo del potenciómetro calibrado y tomar la lectura, se realizó la misma acción para la medición de pH del exudado autoclavado.

La medición de °Brix se realizó con un refractómetro digital calibrado, consistió en tomar 10 µL de exudado y colocar en la lente y realizar la lectura, se repitió la misma acción para la medida del °Brix del exudado autoclavado. Todas las lecturas se realizaron por triplicado.

3.6.10.3. Acondicionamiento del fermentador.

Se utilizó botellas Pírex de laboratorio de 500 ml estériles para utilizarlos como fermentador (ver anexo 6). Se preparó 12 fermentadores (unidades experimentales) ya que el trabajo presento 4 tratamientos (*Saccharomyces Cerevisiae*, levadura “a”, levadura “b” y levadura “c”) y 3 repeticiones para cada tratamiento, el inóculo represento el 1,5% v/v del mosto total (400 ml), la concentración celular de todos los inóculos fue de 10^7 células/ml, se consideró que el volumen del mosto con respecto al volumen total del fermentador fue del 70%, se aplicó esta relación siguiendo lo recomendado por Owen (1991).

3.6.10.4. Evaluación de la fermentación.

Para comprobar y evaluar el proceso de fermentación se midió los °Brix cada 6 horas durante los primeros 2 días a partir del día 3 las mediciones se hicieron con menores intervalos de tiempo (4 horas), con la finalidad de poder determinar el tiempo de fermentación para cada levadura (tratamiento), estos intervalos de medición se establecieron en función a las pruebas preliminares de esta investigación. Las muestras para medir los °Brix se tomaban a través de un sistema de mangueras incorporados al fermentador, en donde el flujo de materia era desde el interior del fermentador hacia el exterior, evitando así el ingreso de oxígeno. Concluido el proceso de fermentación, para cada tratamiento y repetición se procedió a medir el pH, °Brix y concentración celular final utilizando un potenciómetro, refractómetro y cámara Neubauer respetivamente.

3.6.11. Determinación de alcohol.

Concluida la fermentación se procedió a la determinación de los °GL (Grados Gay Lussac), se tomó 100 ml del sustrato fermentado en un matraz aforado de 500 ml y luego se agregó 50 ml de agua destilada, se neutralizo el fermentado empleando 10 ml de óxido de calcio al 12% m/v. Se preparó el equipo de destilación simple conformado por: matraz de destilación, cocina eléctrica, soporte universal, adaptadores, serpentín refrigerante y el matraz aforado que recibe el destilado. Se procede a realizar el destilado de forma continua y lenta (Cousco 2012).

Se recogió el destilado en el matraz y este se llevó a una probeta de 100 ml, se enrazo el destilado alcohólico a 100 ml con agua destilada y se realizó la medición de los °GL empleando un alcoholímetro (Copper-Smith 2016).

3.6.12. Análisis químico proximal del exudado.

Se tomó como muestra para análisis 2 L exudado de cacao CCN-51 procedente del cajón fermentador del mismo fundo en el que se hizo el muestreo de aislamiento. La muestra fue congelada y posteriormente se realizó un análisis químico proximal en los laboratorios de Natura en la ciudad de Pucallpa.

3.7. DISEÑO ESTADÍSTICO DE LA INVESTIGACIÓN.

3.7.1. Diseño Experimental.

Se utilizó un DCA (diseño completamente al azar) para realizar el ordenamiento del trabajo de investigación, se realizó una prueba de comparación Dunnett por adecuarse al trabajo, se utilizó un $\alpha = 0,05$ y el programa IBM SPSS Statistics 24 (Ver Anexo 1).

3.7.2. Tratamientos.

Los tratamientos que se utilizaron fueron los siguientes:

- T1: levadura comercial (*Saccharomyces Cerevisiae*): Testigo.
- T2: cepa aislada “a” seleccionada en prueba de yodoformo.
- T3: cepa aislada “b” seleccionada en prueba de yodoformo.
- T4: cepa aislada “c” seleccionada en prueba de yodoformo.

3.7.3. Análisis estadístico.

- Detalles del diseño:

Números de tratamientos: 4

Números de repeticiones: 3

Números de Unidades Experimentales: 12

- Modelo Matemático:

$$Y_{ij} = \mu + T_i + E_{ij}$$

Dónde:

Y_{ij} = Una observación cualquiera, j – ésima observación en el i – ésimo tratamiento en estudio.

μ = Media general.

T_i = Efecto del i – ésimo tratamiento en estudio.

E_{ij} = Error residual.

Cuadro 6. Esquema ANVA.

F.V.	G.L.
Tratamiento	3
Repeticiones	2
Error	6
Total	11

3.7.4. Tipo y nivel de investigación.

Una investigación básica aplicada.

3.7.5. Población y muestra.

La población considerada para el presente estudio fue la producción mensual correspondiente a 100 L de exudado de cacao CCN-51 procedente de las parcelas del Sr. Dante Pizarro, La muestra utilizada corresponde al 20% que hace un total de 20 L.

3.8. MEDICIÓN DE VARIABLES.**3.8.1. Variables independientes.**

- Cepas de levaduras (inóculos)
 - Levadura comercial (*Saccharomyces Cerevisiae*).
 - Cepa aislada “a” seleccionada en prueba de yodoformo.
 - Cepa aislada “b” seleccionada en prueba de yodoformo.
 - Cepa aislada “c” seleccionada en prueba de yodoformo.

3.8.2. Variables de pendientes.

- Rendimiento alcohólico.
- Consumo de °Brix.

- Concentración celular final.
- Tiempo de fermentación.

3.8.3. Descripción de técnica e instrumentos de recolección de datos.

Se utilizó la técnica de la observación del investigador (evaluación instrumental) y el análisis de documentos, además recopilaciones de datos de fuentes secundarias, como libros, informes y otros documentos que son indispensables como fuente de datos de toda investigación actual. Los instrumentos para la recolección de datos fueron: Refractómetro, balanza analítica, balanza de precisión, pH-metro, microscopios ópticos y alcoholímetro.

IV. RESULTADOS Y DISCUSIONES.

4.1. AISLAMIENTO DE LEVADURAS NATIVAS.

4.1.1. Muestreo y aislamiento.

Se obtuvieron 4 tipos de muestras, todas ellas con características especiales para el aislamiento, las que se codifican y enumeran en el cuadro 7:

Cuadro 7. Codificación y descripción de muestras para el aislamiento de levaduras nativas del área de fermentación de cacao CCN-51. San Alejandro, Ucayali – Perú.

Muestra y código	Descripción
Tierra: (T)	Es la tierra que se encuentra en la parte inferior del cajón fermentador, que en cada fermentación siempre tiene contacto con el exudado de cacao.
Exudado de cacao: (E)	Obtenido directamente del cajón fermentador.
Hojas: (H)	Pedazos de hojas secas que tuvieron contacto con el exudado de cacao en el área de fermentación de cacao,
Cáscara de cacao: (M)	Son las cascaras de cacao CCN-51 quebradas, estas se tomaron del área de fermentación.

El tiempo de crecimiento de los microorganismo sembrados en el medio selectivo YPD fue de 3 días, en el cuadro 8 se describen las observaciones.

Todas la colonias que crecieron presentaron colores como blanco, crema y degradados de estos colores. La textura de las colonias fue pastosa, de superficie lisa para la mayoría de colonias, presentándose también colinas con superficie rugosa. Como indica Schlegel (1997), estas características son las más representativas de las levaduras cuando crecen en medio sólido,

diferenciándolas de los hongos que crecen formando micelios aéreos generalmente, con una textura muy diferente a la pastosas que se observaron en las placas Petri en esta investigación.

Cuadro 8. Observación de placas Petri en la siembra de microorganismos (en medio YPD selectivo para levaduras) de muestras para el aislamiento de levaduras nativas del área de fermentación de cacao CCN-51. San Alejandro, Ucayali – Perú.

Muestra	Diluciones	Observación
T: Tierra	$T_1: (10^{-1})$	Se observó el crecimiento de 2 tipos de colonias blanco lizo en la superficie y otro rugoso en la superficie.
	$T_2: (10^{-2})$	Se observó las mismas colonias que en T_1 .
	$T_3: (10^{-3})$	Se observó las mismas colonias que en T_1 .
	$T_4: (10^{-4})$	Se observó al detalle el crecimiento de 4 unidades formadoras de colonias (ufc), de las mismas características de las colonias anteriores, alta probabilidad de ser levaduras.
E: exudado de cacao CCN-51	$E_1: (10^{-1})$	Se observó el crecimiento de 3 ufc de superficie liza.
	$E_2: (10^{-2})$	El crecimiento de 2 ufc semejantes a la placa E_1 .
	$E_3: (10^{-3})$	No presento crecimiento de colonias.
H: hojas secas en contacto con exudado de cacao	$H_1: (10^{-1})$	Se observó el crecimiento de 2 tipos de colonias con altas posibilidades de ser levaduras, de color blanco y crema.
	$H_2: (10^{-2})$	Se observó los mismos tipos de colonias que H_1 .
	$H_3: (10^{-3})$	Se observó el crecimiento de 3 ufc semejante a H_1 y H_2 .
M: cáscara de cacao con mucilago en el interior	$M_1: (10^{-1})$	Se observó 3 ufc de diferentes características morfológicas, con alta posibilidad que sea levaduras.
	$M_2: (10^{-2})$	Se observa el crecimiento de 2 ufc uno de aspecto lizo y el otro de superficie rugosa de color blanco y crema respectivamente.
	$M_3: (10^{-3})$	Presento las mismas observaciones de la M_2 .

Los subíndices 1, 2, 3 y 4 es la forma de ordenar las diluciones de cada muestra.

A las colonias aisladas se les asignó codificaciones consecutivas, encontrándose siete colonias de alta posibilidad de ser levaduras, todas ellas de características morfológicas diferentes las que se describen en el cuadro 9.

Cuadro 9. Observaciones y características morfológicas de cepas de levaduras nativas aisladas del área de fermentación de cacao CCN-51 (medio PDA). San Alejandro, Ucayali – Perú.

Cepa	Origen	Observaciones y características
L1	M	La superficie de crecimiento es de característica lisa, el color de la colonia es crema, los bordes de la colonia es irregular, la textura es pastosa.
L2	M	La superficie de la colonia es lisa, el color de la colonia es blanco, los bordes de la colonia son regulares de forma circular.
L3	M y H	La superficie de la colonia es rugosa, el color de la colonia es crema y los bordes de la colonia son regulares de forma circular.
L4	T	La superficie del crecimiento es lisa, el color de la colonia es crema, observándose anillos en la parte central hay una acumulación como en forma puntiaguda de color crema.
L5	E	La superficie de crecimiento es lisa, el color de la colonia es crema casi transparente y los bordes de la colonia son regulares de forma circular.
L6	H	La superficie de crecimiento es lisa, el color de la colonia es crema muy intensa y los bordes de la colonia son irregulares.
L7	T	Las colonias son lisas, son de tamaño muy pequeña en comparación a las demás cepas, el color es casi blanco transparente por los bordes y en la parte central de color blanco, los bordes son uniformes de forma circular.

El número de cepas de levaduras nativas aisladas en esta investigación (07 cepas de levaduras) está en el rango del número reportadas por Márquez y Salazar (2015), quienes reportaron los géneros de levaduras en la fermentación del grano de cacao son: *Cándida*, *Dedaryomyces*, *Hansenulaa*, *Kloeckera*, *Pichia*, *Rhodotorula*, *Saccharomyces* y *Torulopsis*.

La presencia de las levaduras en las diferentes muestras respaldan y confirman la postura de Schlegel (1997), quien señala que estos microorganismo estan presentes en todos los ambientes que cuenten con nutrientes adecuados. Las muestras obtenidas estan en contactacto o estuvieron en contanco con el exudado de cacao CCN-51.

4.1.2. Obtención de cepas en suspensión.

El crecimiento de las cepas de levaduras aisladas en caldo YPD tuvo una duración de 3 días. En la cuadro 10 se presenta las observaciones realizadas a las 24 horas de crecimiento.

Como menciona Schlegel (1997), los microorganismos reaccionan de forma diferentes según el medio que se emplee, este dependerá de la condiciones de, pH, tipo de carbono, nitrógeno, presión osmótica, vitaminas y otros. Según el tipo de cepa sembrada, el cultivo discontinuo presentara cambios diferentes, como el color de los cultivos, formación de películas, acumulación de levaduras, etc. En el cuadro 10 se observa que algunas cepas como es el caso de la L1 y L2 presentan crecimiento celular abundante, otras como L5 presentan un crecimiento celular escaso, esto contribuye a la postura que son diferentes cepas de levaduras nativas. En el ensayo se pudo observar la semejanza en las repeticiones y las diferencias entre tipos de cepas.

Cuadro 10. Crecimiento de cepas de levaduras nativas aisladas del área de fermentación de cacao CCN-51. San Alejandro, Ucayali – Perú en caldo YPD a las 24 h.

Código	Observaciones a 24 horas en incubación
L1R	Se formó una película superficial blanca, en la base del matraz se acumuló materia celular, abundante crecimiento.
L1R2	Presencia de película blanca en la superficie, acumulación de crecimiento celular en la parte inferior del matraz.
L1R3	Presencia de una película superficial blanca, acumulación de cuerpo celular en la parte inferior del matraz, Abundante crecimiento.
L2R	Formación células en la parte superior (película) y en la parte inferior del matraz una acumulación de células.
L2R2	Crecimiento de una película y acumulación de células en la parte inferior del matraz.
L2R3	Formación de una película en la superficie y acumulación de células en la parte inferior del matraz y abundante crecimiento.
L3R	Acumulación del crecimiento celular en la superficie del matraz, abundante crecimiento.
L3R2	Acumulación del crecimiento celular en la superficie y una pequeña cantidad en la parte inferior del matraz, abundante crecimiento.
L3R3	Se formó una película superficial de levaduras.
L4R	No presento crecimiento celular en la superficie, pero si hubo un regular crecimiento celular acumulado en la parte inferior del matraz.
L4R2	No hay presencia de crecimiento en la superficie o presencia de película, pero si acumulación crecimiento celular en la parte inferior.
L4R3	Crecimiento celular en la parte inferior del matraz, no presenta película o alguna acumulación en la superficie.
L5R	No presenta crecimiento en la superficie, escaso crecimiento en la base del matraz.
L5R2	No presenta crecimiento en la superficie, escaso crecimiento en la base del matraz.
L5R3	No presenta crecimiento en la superficie, escaso crecimiento en la base del matraz.
L6R	No presenta película en la parte superior, abundante crecimiento y acumulación de celular en la parte inferior del matraz.
L6R2	No presenta película en la parte superior, abundante crecimiento y acumulación de celular en la parte inferior del matraz.
L6R3	No presenta película en la parte superior, abundante crecimiento y acumulación de celular en la parte inferior del matraz.
L7R	Crecimiento celular no muy abundante, acumulado en la parte inferior del matraz.
L7R2	Crecimiento celular no muy abundante, acumulado en la parte inferior del matraz.
L7R3	Crecimiento celular no muy abundante, acumulado en la parte inferior del matraz.

4.1.3. Microscopia de las cepas nativas aisladas.

Todas las cepas aisladas presentaron diferencias microscópicas, en el cuadro 11 y el anexo 9 se presenta estas observaciones.

Cuadro 11. Observación y características microscópicas de las cepas de levaduras nativas aisladas del área de fermentación de cacao CCN-51. San Alejandro, Ucayali – Perú.

Cepa	Observaciones y características
L1	Son células de forma ovoide, presenta las células de mayores dimensiones con respecto a las otras, presenta las características propias de una levadura, se puede apreciar el núcleo de la células, también se puede observar las células mientras están en plena gemación, microscópicamente se confirma que es una levadura.
L2	Son células alargadas de tamaño regular, con visibilidad de núcleo, se observa la gemación en estas células, se confirma que son levaduras.
L3	Son células ovoides de tamaño regular, el núcleo es difícil de observar, se observa la presencia de gemación, se confirma que es una levadura.
L4	Son células de forma circular, de tamaño regular, se puede apreciar el núcleo y varias células estas en constante gemación, se confirma que es una levadura.
L5	Son células pequeñas redondas, no se puede observar de forma detallada el núcleo, pero si se observa la presencia de gemación, se confirma de esta manera que es una levadura.
L6	Células pequeñas de forma ovoides, se puede apreciar el núcleo, se observa la presencia de gemación, se confirma que son levaduras.
L7	Son células ovoides de tamaño regular, se observa el núcleo y la gemación de las células se confirma que es una levadura.

Las observaciones mostradas en el cuadro 11 nos indican que las cepas aisladas son cultivos puros de levaduras, se observa la reproducción asexual característica de las levaduras, la gemación (Owen 1991). El gran número de especies que posee un género de levadura hace difícil una identificación del tipo de levadura, para hacer esta identificación es necesaria realizar pruebas bioquímicas y genéticas de ADN.

4.1.4. Concentración celular y obtención de inóculos.

La variación en la concentración celular (células/ml) es causada por las diferentes características inherentes de las siete cepas al someterlas al crecimiento aerobio en caldo YPD como se muestra en el cuadro 12.

Cuadro 12. Conteo de levaduras en cámara Neubauer y obtención de inóculos de cepas aisladas del área de fermentación de cacao CCN-51. San Alejandro, Ucayali – Perú.

N°	Muestra	Cuadrantes en cámara Neubauer						Concentración	Elaboración de inóculos		
		C 1	C 2	C 3	C 4	C 5	Promedio	Células/ml	Muestra (ml)	H2O (ml)	Inoculo (ml)
1	L1R	71	85	77	63	103	80	199500000	1	18,95	19,95
2	L1R2	97	123	110	83	87	100	250000000	1	24	25
3	L1R3	71	85	77	63	103	80	199500000	1	18,95	19,95
4	L2R	140	124	118	129	116	125	313500000	1	30,35	31,35
5	L2R2	102	116	116	159	119	122	306000000	1	29,6	30,6
6	L2R3	101	99	119	100	99	104	259000000	1	24,9	25,9
7	L3R	80	97	114	86	64	88	220500000	1	21,05	22,05
8	L3R2	109	81	92	73	93	90	224000000	1	21,4	22,4
9	L3R3	107	135	98	78	95	103	256500000	1	24,65	25,65
10	L4R	13	17	19	10	16	15	37500000	1	2,75	3,75
11	L4R2	21	11	10	9	18	14	34500000	1	2,45	3,45
12	L4R3	13	14	19	20	16	16	41000000	1	3,1	4,1
13	L5R	21	8	4	4	10	9	23500000	1	1,35	2,35
14	L5R2	6	5	4	4	5	5	12000000	1	0,2	1,2
15	L5R3	10	4	7	10	11	8	21000000	1	1,1	2,1
16	L6R	4	20	18	9	1	10	26000000	1	1,6	2,6
17	L6R2	4	7	10	5	13	8	19500000	1	0,95	1,95
18	L6R3	5	9	4	30	0	10	24000000	1	1,4	2,4
19	L7R	104	136	143	159	119	132	330500000	1	32,05	33,05
20	L7R2	86	128	92	129	95	106	265000000	1	25,5	26,5
21	L7R3	90	90	89	100	135	101	252000000	1	24,2	25,2

4.2. SELECCIÓN DE CEPAS DE LEVADURAS NATIVAS.

4.2.1. Fermentación de caldo YPD.

El caldo YPD es un medio ideal para el desarrollo de las levaduras, es por ello que en las pruebas de fermentación todas las cepas aisladas presentaron actividad celular en condiciones aerobias, se observó cualitativamente la diferencia en el crecimiento celular al cambiar las condiciones de crecimiento de un medio aerobio a uno anaerobio, utilizando el mismo caldo de propagación (YPD). Estos cambios son debido a la disminución en la generación de Adenosin Trifosfato (ATP) al no poder realizar una metabolización completa de la glucosa por ausencia de oxígeno (Schlegel 1997). Los cambios en el comportamiento de las levaduras en condiciones anaerobias se observan en el cuadro 13.

Cuadro 13. Fermentación en caldo YPD de las siete cepas de levaduras nativas aisladas del área de fermentación de cacao CCN-51. San Alejandro, Ucayali – Perú.

Cepa	Observaciones de fermentación en caldo YPD
L1R1, L1R2, L1R3	En la superficie del matraz se forma una película blanca abundante.
L2R1, L2R2, L2R3	Se formó una película blanca en mayor proporción que la L1.
L3R1, L3R2, L3R3	Se observa la formación de una película no muy abundante.
L4R1, L4R2, L4R3	Formación de una película muy escasa, presencia de espuma.
L5R1, L5R2, L5R3	No hay formación de película o espuma, escaso crecimiento.
L6R1, L6R2, L6R3	No se observa formación alguna de espuma o película.
L7R1, L7R2, L7R3	Se puede observar la formación de película.

La formación de películas en las superficies en fermentación son características de los géneros de levaduras: *Saccharomyces*, *Candida*, *Pichia*,

Hansénula y *Zygosaccharomyces*. La formación de espuma es una de las señales que indican el proceso de una fermentación y la presencia de levaduras de los géneros: *Saccharomyces*, *Candida*, *Kloeckera*, *Metschnikowia*, *Schizosaccharomyces* y otros (Blanco s.f., Schlegel 1997).

4.2.2. Prueba de yodoformo.

La fermentación de caldo YPD fue de cuatro días, al comparar los resultados con los blancos se presentó los siguiente comportamiento en el cuadro 14.

Cuadro 14. Evaluación cualitativa para la selección de levaduras productoras de alcohol aisladas del área de fermentación de cacao CCN-51. San Alejandro, Ucayali – Perú.

Cepa	Prueba de yodoformo caldo YPD
L1R1	+
L1R	+
L1R2	+
L2	+
L2R	-
L2R2	-
L3	+
L3R	+
L3R2	+
L4	++
L4R	++
L4R2	++
L5	-
L5R	-
L5R2	-
L6	+
L6R	-
L6R2	-
L7	+
L7R	-
L7R2	-

En el cuadro 14 y Anexo 7, se observa que tres cepas presentaron precipitado en la prueba de yodoformo, comparables a los blancos de etanol con caldo YPD, estos fueron: L1, L3 y L4. Estas cepas fueron seleccionadas para los tratamientos (T2, T3, y T4 respectivamente), siendo la levadura comercial *Saccharomyces cerevisiae* el tratamiento control (T1).

4.3. ANÁLISIS QUÍMICO PROXIMAL DE EXUDADO.

El análisis permitió comprobar la presencia de componentes nutricionales esenciales en el exudado de cacao CCN-51, como carbohidratos, proteínas y otros, los cuales se aprecian en el Anexo 8.

Cuadro 15. Análisis de pH y °Brix de exudado de cacao CCN-51 y exudado autoclavado CCN-51 procedente de San Alejandro, Ucayali – Perú.

Parámetro	Exudado	Exudado autoclavado
pH	3,5	3,2
°Brix	18,7	18,7

En el cuadro15 se presenta los parámetros de pH y °Brix los más influyentes en el proceso de fermentación. El pH en el exudado fue de 3,5; siendo similar a lo reportado por Alarcon (2013) quien encontró un pH de 3,68. Villagómes y Argüello (2013) reportaron un pH de $3,79 \pm 0,3$. Por otro lado el cambio de pH que se presentó después del autoclavado pudo ser ocasionado por el efecto térmico del mismo, ya que producen reacciones químicas que tienen influencias en el cambio de pH (Díaz y Clotet 1995).

El valor de 18,7 °Brix que se determinó es superior a los reportados por Alarcon (2013) y el reportado por Villagómes y Argüello, 2013 de 16,8 y 15 °Brix respectivamente. Estas variaciones en el pH, °Brix y el análisis químico proximal

que se reportan, se basa en las diferentes condiciones agroecológicas en las zonas geográficas del cultivo del cacao CCN-51 (INTAGRI S.C. 2017).

4.4. FERMENTACIÓN DE EXUDADO DE CACAO CCN-51.

Las unidades experimentales fueron de un volumen de 400 ml de exudado de cacao CCN-51 autoclavado, el volumen del inóculo para cada unidad experimental fue de 6 ml a una concentración de 10^7 células/ml, es importante resaltar que en las unidades experimentales se produjeron fermentaciones discontinuas. En el cuadro 16 se presenta un resumen de los datos obtenidos en la fermentación.

Cuadro 16. Resumen de los principales datos de la fermentación de exudado de cacao CCN-51 empleando como inóculo cepas de levaduras nativas aisladas del área de fermentación de cacao CCN-51. San Alejandro, Ucayali – Perú.

PARAMETROS	°Brix			CONCENTRACIÓN (células/ml)			pH		TIEMPO (h)	°GL
Unidad Experimental	Inicial	Residual	Utilizado	Inicial	Final	Incremento	Inicial	Final		
T1R1	18,7	8,9	9,8	24630,5419	49500000	49475369,46	3,2	3,7	256	8,7
T1R2	18,7	8,7	10	24630,5419	41500000	41475369,46	3,2	3,7	256	8,6
T1R3	18,7	8,7	10	24630,5419	31500000	31475369,46	3,2	3,7	248	8,7
T2R1	18,7	16,7	2	24630,5419	77000000	76975369,46	3,2	3,6	188	0,7
T2R2	18,7	16,5	2,2	24630,5419	78000000	77975369,46	3,2	3,6	200	0,6
T2R3	18,7	16,6	2,1	24630,5419	85500000	85475369,46	3,2	3,6	176	0,7
T3R1	18,7	18,2	0,5	24630,5419	53000000	52975369,46	3,2	3,5	24	0
T3R2	18,7	18,2	0,5	24630,5419	63500000	63475369,46	3,2	3,5	24	0
T3R3	18,7	18,3	0,4	24630,5419	65500000	65475369,46	3,2	3,5	24	0
T4R1	18,7	8,8	9,9	24630,5419	167000000	166975369,5	3,2	3,7	248	8,7
T4R2	18,7	8,8	9,9	24630,5419	159000000	158975369,5	3,2	3,6	233	8,5
T4R3	18,7	8,7	10	24630,5419	156500000	156475369,5	3,2	3,7	240	8,6

Dónde: **T1** = *S. cerevisiae*, **T2** = (L1), **T3** = (L3) y **T4** = (L4).

4.4.1. Consumo de °Brix.

Todas la unidades experimentales iniciaron el proceso de fermentación con 18,7 °Brix, al transcurrir el tiempo de fermentación se observó la disminución de los °Brix. El cambio de este parámetro se debe a que las levaduras metabolizan los azúcares (solidos solubles). Se presentan gráficos en donde se observa curvas del cambio de °Brix en el proceso de fermentación.

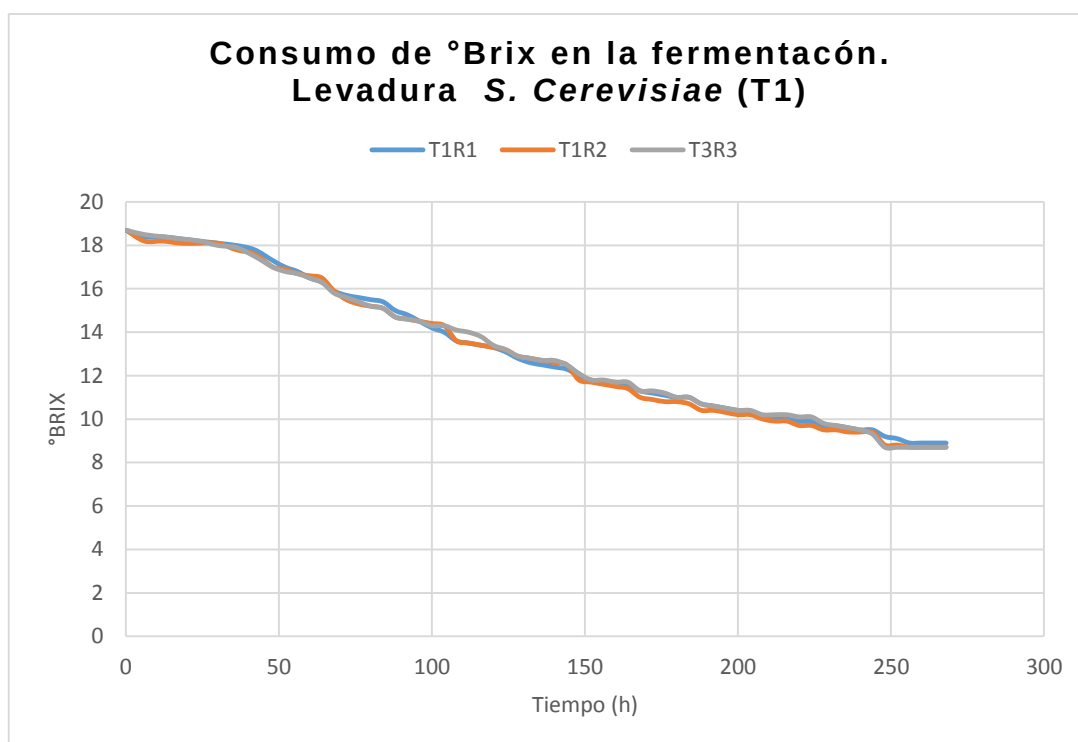


Figura 4. Fermentación de exudado de cacao CCN-51. Curva de °Brix en *S. cerevisiae* (T1). San Alejandro, Ucayali – Perú.

En la figura 4 se presenta el comportamiento de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* comercial (T1), la figura está constituida por las curvas del consumo de los °Brix de las tres repeticiones, se pudo diferenciar las tres etapas de crecimiento que se espera en una fermentación discontinua, la etapa de latencia, la exponencial y la estacionaria. Como se observa esta levadura pudo metabolizar el exudado de cacao CCN-51 hasta llegar a un estado

estacionario de 8,7 °Brix en un tiempo de 10 días con 13.3 horas en promedio (253,3 h).

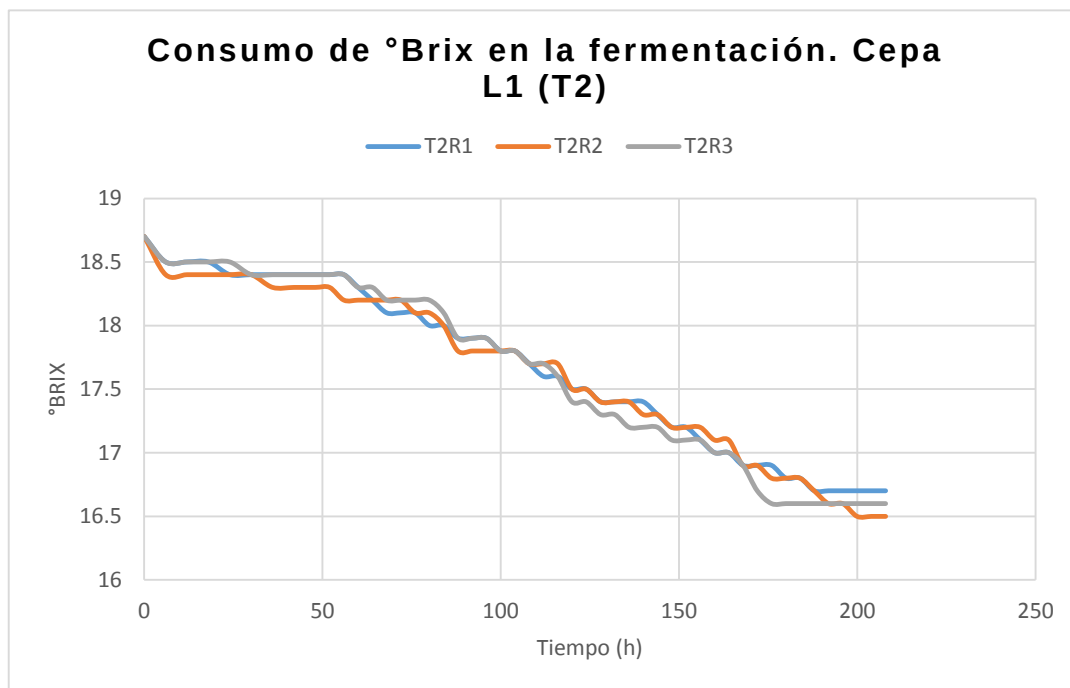


Figura 5. Fermentación de exudado de cacao CCN-51. Curva de °Brix en cepa L1 (T2). San Alejandro, Ucayali – Perú.

En la figura 5 se puede apreciar que en las tres repeticiones del T2 solo se logró metabolizar el exudado de cacao CCN-51 hasta 16,6 °Brix en un tiempo promedio de 7 días con 20 horas (188 horas). Las curvas permiten observar el consumo de °Brix y el comportamiento de la cepa L1, observándose las tres etapas de crecimiento característico en una fermentación discontinua.

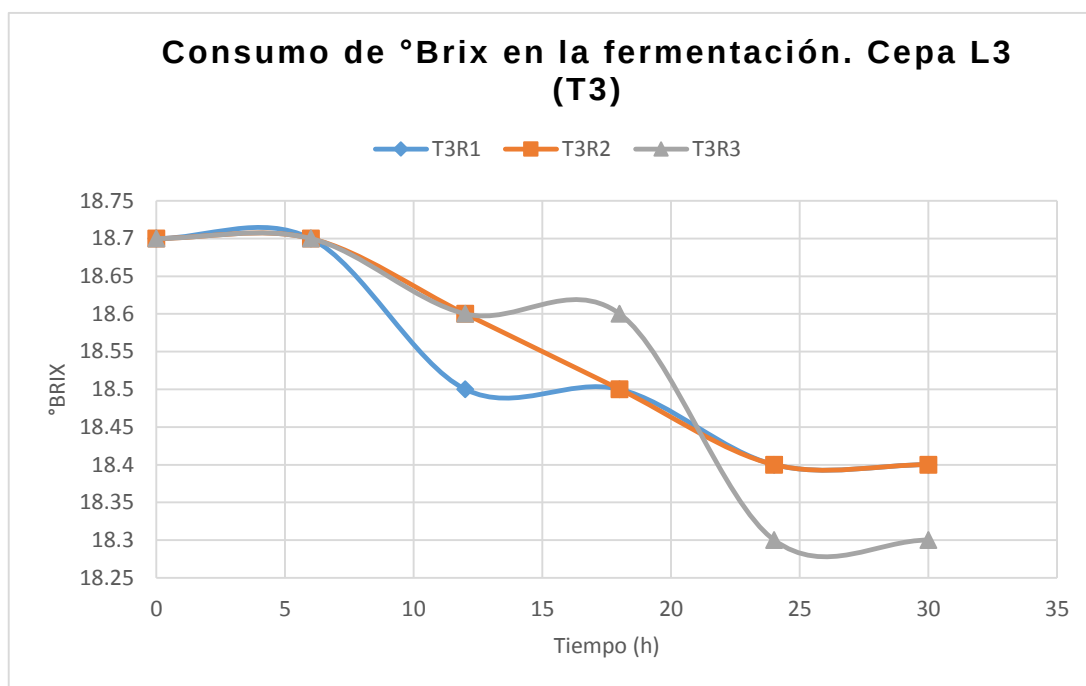


Figura 6. Fermentación de exudado de cacao CCN-51. Curva de °Brix en cepa L3 (T3). San Alejandro, Ucayali – Perú.

La figura 6 presenta el T3 y sus tres repeticiones, esta cepa tuvo una mínima metabolización del exudado de cacao CCN-51 en condiciones anaerobias, esto se refleja en el escaso consumo de °Brix, llegando a un estado estacionario de 18,3 °Brix en un tiempo de 1 día en promedio (24 h) un consumo prácticamente nulo pues se inició con 18,7 °Brix.

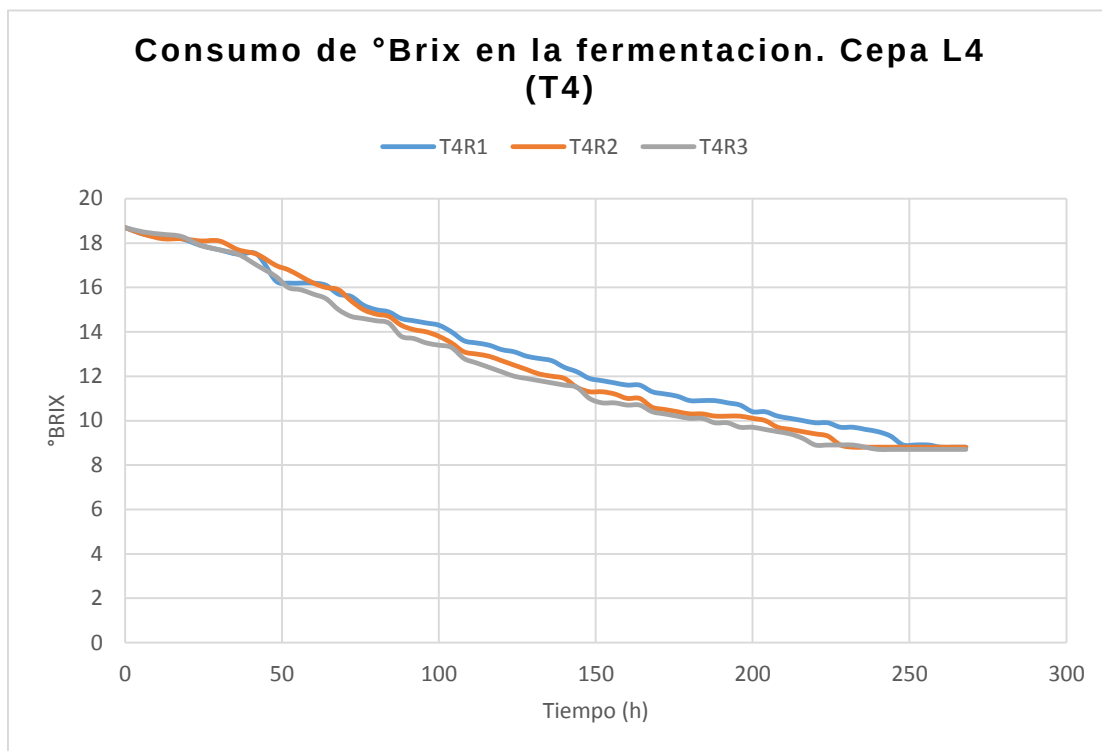


Figura 7. Fermentación de exudado de cacao CCN-51. Curva de °Brix en la cepa L4 (T4). San Alejandro, Ucayali – Perú.

La figura 7 presenta el T4 y repeticiones esta cepa si tuvo un evidente consumo de °Brix y por ende la fermentación del exudado de cacao CCN – 51, esta cepa llego al estado estacionario a los 8,7 °Brix en un tiempo de 10 días con 3,3 horas en promedio (243,3 h). En las curvas se puede apreciar las correspondientes etapas de latencia, crecimiento exponencial y estacionario.

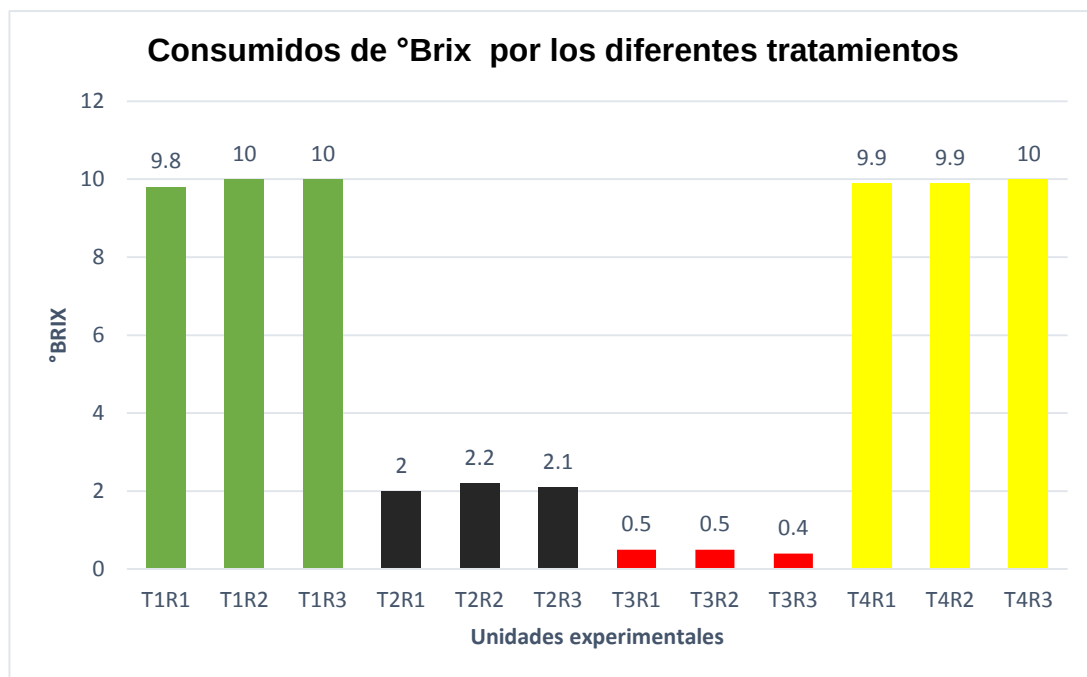


Figura 8. Comparación entre tratamientos en consumo de °Brix en el proceso de fermentación de exudado de cacao CCN-51. San Alejandro, Ucayali – Perú.

En la figura 8 se observa que el T4 y el T1 presentan un comportamiento semejante en el consumo de °Brix. En cambio el T2 y T3 presentaron los menores consumos de °Brix, siendo el T3 el de menor consumo.

Cuadro 17. Consumo final de °Brix en los diferentes tratamientos en la fermentación de exudado de cacao CCN-51. San Alejandro, Ucayali – Perú.

Tratamiento (cepa)	Promedio (°Brix)	Desviación estándar (°Brix)
T1 (<i>S. cerevisiae</i>)	9,93	0,115
T2 (L1)	2,1	0,1
T3 (L3)	0,46	0,057
T4 (L4)	9,93	0,057

El cuadro 17 muestra que el T3 fue la cepa que tuvo una escasa actividad celular en el sustrato de exudado de cacao CCN-51 en condiciones anaerobias, metabolizó solo 0,46 °Brix en promedio, además presentó una

desviación estándar de 0,057 haciendo muy reproducible las fermentaciones. El otro tratamiento con baja actividad celular en condiciones anaerobias fue el T2 la cepa L1, metabolizo 2,1 °Brix en promedio, con una desviación estándar de 0,1 lo cual indica la reproducibilidad de las fermentaciones. Los tratamientos T1 y T4 fueron los que tuvieron la mayor actividad celular, esto se refleja en la metabolización de 9,93 °Brix en promedio para ambos tratamientos, la desviación estándar para T1 es 0,115 y T4 es 0,057 demostrándose que son fermentaciones reproducibles. En el análisis ANVA de esta variable respuesta se presentó diferencias significativas y presento un coeficiente de variabilidad de 1,54% (Ver Anexo 1).

Los tratamientos T2 y T3 presentaron diferencias estadísticas según la prueba Dunnett ($p > 0,05$) al compararla con el tratamiento control T1 (*S. cerevisiae*). Por otro lado el tratamiento T4 en la prueba de Dunnett ($p < 0,05$) no presento diferencias estadísticas. Esto se podría deber a que la L4 podría pertenecer al género de las *Saccharomyces*.

La metabolización de los sólidos solubles (°Brix) (sustrato) tiene una relación directa con otros parámetros como la concentración celular, y la producción de alcohol en una fermentación discontinua (Owen 1991).

4.4.2. Tiempo de fermentación.

La figura 9 presenta la comparación del tiempo de fermentación de los diferentes tratamientos y sus respectivas repeticiones. Cualitativamente el T4 y T1 (*S. cerevisiae*) presentan un comportamiento semejante en el tiempo de fermentación siendo estas las que tuvieron el mayor tiempo en actividad celular.

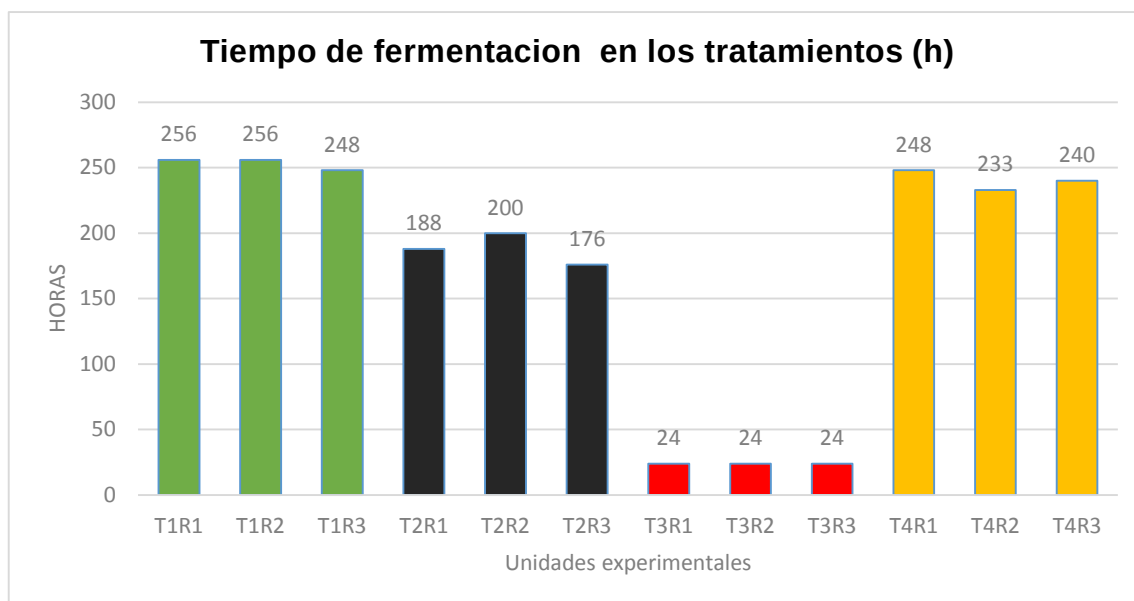


Figura 9. Tiempo transcurrido de los tratamientos al concluir el proceso de fermentación de exudado de cacao CCN-51. San Alejandro, Ucayali – Perú.

El T2 es la tercera cepa con mayor actividad celular y el T3 fue la cepa que presento el menor tiempo de actividad celular.

Cuadro 18. Tiempo de fermentación de exudado de cacao CCN-51. San Alejandro, Ucayali – Perú.

Tratamiento (cepa)	Promedio (h)	Desviación estándar (h)
T1 (<i>S. cerevisiae</i>)	253,3 (10 días con 13,3 h)	4,61
T2 (L1)	188 (7 días con 20 h)	12
T3 (L3)	24 (1 día)	0
T4 (L4)	240,3 (10 días con 3,3 h)	7,50

El cuadro 18 muestra que el T3 fue la cepa que tuvo el menor tiempo de actividad celular en el exudado de cacao CCN – 51 en condiciones anaerobias, fermento 24 horas (1 día) en promedio, estos tiempo tiene lógica si comparamos la escasa metabolización de °Brix que presenta esta cepa. El T2

fue la cepa que tuvo un tiempo de actividad celular de 188 horas en promedio (7 días con 20 h), con una desviación estándar de 12 h, un valor relativamente bajo que indica la reproducibilidad de las fermentaciones. Los tratamientos T1 y T4 fueron los que tuvieron los mayores tiempos de fermentación, 253,3 h (equivalente a 10 días con 13.3 h) y 240,33 h (equivalente a 10 días con 3,3 h) en promedio respectivamente, la desviación estándar para T1 fue 4,61 y T4 es 7,50 demostrándose que son fermentaciones reproducibles. En el análisis ANVA de esta variable respuesta se presentó diferencias significativas y presento un coeficiente de variabilidad de 4,21% (Ver Anexo 1).

Los tratamientos T2 y T3 presentaron diferencias estadísticas según la prueba Dunnett ($p > 0,05$) al compararlas con el tratamiento control T1 (*S. cerevisiae*). El T2 presenta un tiempo muy prolongado (188 h) para el poco consumo de azúcares (2,1 °Brix) del exudado de cacao CCN-51, característica industrial no deseable. El tiempo del T3 refleja la incapacidad de la cepa L3 a metabolizar el exudado cacao CCN-51 en condiciones anaerobias. Por otro lado el tratamiento T4 en la prueba de Dunnett ($p < 0,05$) no presento diferencias estadísticas al compararlas con el tratamiento control T1 (*S. cerevisiae*), el tiempo de fermentación es muy prolongado pero se justifica con el alto consumo de azúcares igual que tratamiento control.

Los tiempos de fermentación en este trabajo de investigación son muy prolongados esto se debe a las bajas concentraciones y proporciones de inóculos utilizados, ya que no se buscaba determinar parámetros óptimos si no comparar el comportamiento de las diferentes cepas y utilizar inóculos de baja concentración celular que facilitaron este tipo de trabajo (Garzón y Hernández 2009).

Los tiempos de fermentación de los tratamientos T1 y T4 (10 días) son semejantes a los reportados por Villagómes y Argüello (2013) y Alarcon (2013) quienes emplearon *S. cerevisiae* como inóculo en la fermentación de exudado de cacao CCN-51 en la elaboración de bebidas alcohólicas.

4.4.3. Concentración celular.

La figura 10 indica que el orden de concentración celular final de mayor a menor fue: T4, T1 (control), T2 y T3. La concentración en el fermentador luego de la inoculación es de $2,5 \times 10^4$ células/ml para todas las unidades experimentales (400 ml), se empleó como inóculo un volumen de 6 ml (1,5% en función al volumen total del mosto) a la concentración de 10^7 células/ml para cada tratamiento y repetición.

Como indicia Owen (1991), la fermentación genera moléculas de ATP, con la finalidad de utilizarlos en todas las actividades celulares, una de ellas es la reproducción celular, a mayor reproducción mayor consumo de azúcares y por tanto la generación de metabolitos como el alcohol.

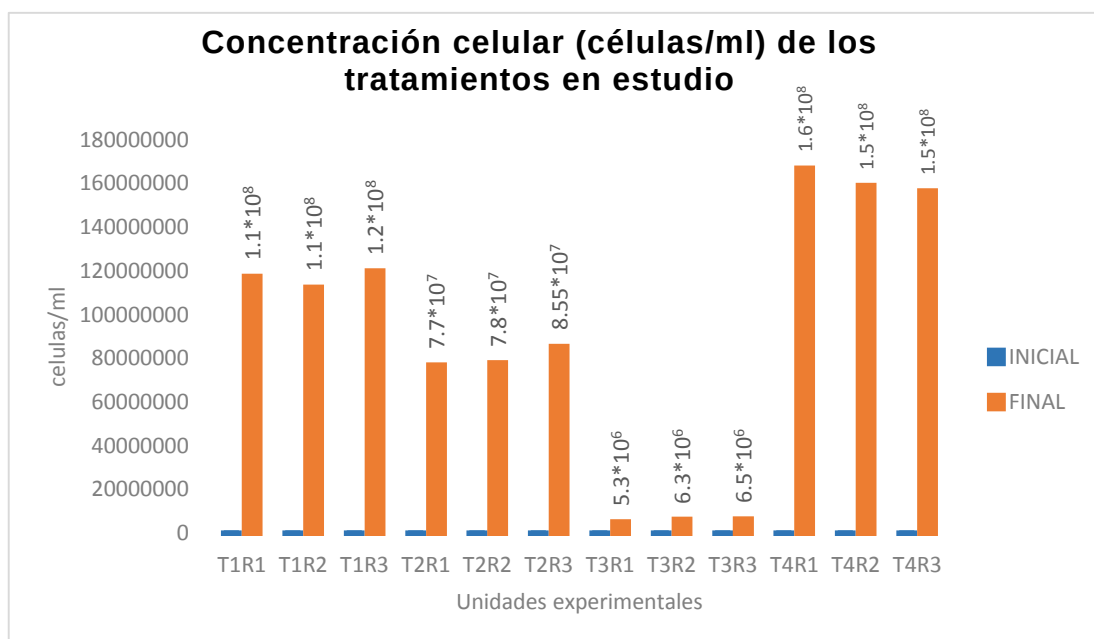


Figura 10. Concentración celular inicial y final en los tratamientos en la fermentación de exudado de cacao CCN-51. San Alejandro, Ucayali – Perú.

Cuadro 19. Incremento de concentración celular en la fermentación de exudado de cacao CCN-51. San Alejandro, Ucayali – Perú.

Tratamiento (cepa)	Promedio (células/ml)	Desviación estándar (células/ml)
T1 (S, cerevisiae)	$1,2 \times 10^8$	3.9×10^6
T2 (L1)	8×10^7	4.6×10^6
T3 (L3)	$6,1 \times 10^6$	6.7×10^5
T4 (L4)	$1,6 \times 10^8$	5.5×10^6

En el análisis ANVA de esta variable respuesta se presentó diferencias significativas y presento un coeficiente de variabilidad de 4,49% (Ver Anexo 1). En el cuadro 19 se observa el incremento de la concentración celular en detalle, los tratamientos T2, T3 y T4 presentaron diferencias estadísticas según la prueba Dunnett ($p > 0,05$) al compararlas con el tratamiento control T1 (*S. cerevisiae*). El T4 es el único con mayor incremento en concentración celular

que el tratamiento control, al concluir la fermentación en el exudado de cacao CCN-51.

4.4.4. Producción y rendimiento alcohólico.

La figura 11 presenta la producción de alcohol en los diferentes tratamientos, estos son expresados en °GL, el T4 y T1 presentaron valores significativos de producción alcohólica, más el T2 presento poca producción de alcohol y por último el T3 tuvo una producción nula de alcohol.

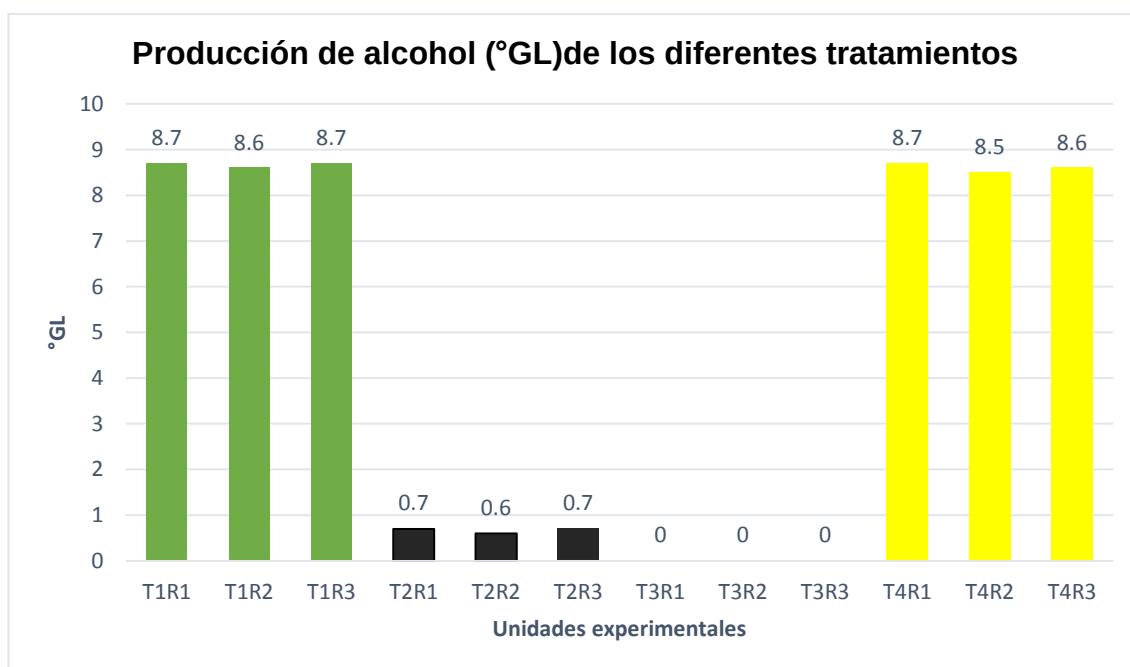


Figura 11. Producción de alcohol de los diferentes tratamientos al concluir la fermentación de exudado de cacao CCN-51. San Alejandro, Ucayali – Perú.

En el cuadro 20 se presentan los valores promedios obtenidos en la fermentación del exudado de cacao CCN-51. En el análisis ANVA de esta variable respuesta se presentó diferencias significativas el coeficiente de variabilidad en el análisis de varianza fue de 1,43%, demostrando que la

evaluación presento datos muy homogéneos y por tanto reproducibles (Ver Anexo 1).

Cuadro 20. Producción de alcohol en la fermentación de exudado de cacao CCN-51. San Alejandro, Ucayali – Perú.

Tratamiento (cepa)	Promedio (°GL)	Desviación estándar (°GL)
T1 (S, <i>cerevisiae</i>)	8,6	0,057
T2 (L1)	0,6	0,057
T3 (L3)	0	0
T4 (L4)	8,6	0,1

En producción de alcohol los tratamientos T2 y T3 presentaron diferencias estadísticas según la prueba Dunnett ($p > 0,05$) al compararla con el tratamiento control T1, estas diferencias se dan por las bajas producciones alcohólicas de 0,6 y 0 °GL en promedio para los T2 y T3 respectivamente. El tratamiento control (T1) *S. cerevisiae* presento una producción de 8,6 °GL en promedio, un valor que supera en creces a los tratamiento anteriores. Por otra parte el T4 no presento diferencias estadísticas según la prueba Dunnett ($p < 0,05$) al compararla con el tratamiento control T1, la producción de alcohol del T4 en promedio fue 8,6 °GL, esto significa que estadísticamente se considera que la levadura control *S. cerevisiae* (T1) produce alcohol en las mismas proporciones que la cepa nativa L4 (T4) utilizando como sustrato el exudado de cacao CCN-51 en un proceso de fermentación a condiciones ambientales.

El rendimiento teórico de 1 g de glucosa es de 0,51 g de etanol y 0,49 g de CO₂. Sin embargo, en la práctica, aproximadamente el 10% de la glucosa se transforma en biomasa y el rendimiento en etanol y CO₂ alcanzando un 90% del valor teórico (Owen 1991). Esta cita es verificada en el presente trabajo de investigación, no todo el azúcar consumido se convirtió en alcohol,

parte de ella se convierte en biomasa (concentración celular), además se observó la relación directa que tiene el consumo de azúcares con la producción de alcohol como el T1 y T4 (consumió 10 °Brix y produjo 8,6 °GL en promedio), más el T2 tuvo un escaso consumo de azúcar (2°Brix) y solo logro producir 0,6 °GL. El T3 que tuvo una lectura de 0 °GL, este valor se debe a la corrección en la lectura del alcoholímetro que se realizó, organolépticamente en el destilado de este tratamiento se podía percibir alcohol, pero el método de cuantificación no es el más idóneo para medir pequeños volúmenes de alcohol así que se marcó 0 °GL en la lectura del alcoholímetro. Esto indica que la levadura es una que está presente al inicio de la fermentación del cacao CCN-51, esto es demostrado debido al abundante crecimiento que dio en caldo YPD en condiciones aerobias.

En la prueba de yodoformo esta levadura fue seleccionada porque presentaba una reacción positiva, esta se podría explicar a la presencia de otros compuesto que pudieran dar positivo a la reacción como el acetaldehído, metilcetonas y metil carbinoles (Lozano *et al.* 2013).

El T2 presenta una mayor tolerancia a alcohol que la T3, esto se refleja en la mayor actividad celular en consumo de °Brix y mayor concentración celular al final de la fermentación en el exudado de cacao.

Villagómez y Argüello (2013), reportaron una producción de 7,1 °GL, valor inferior al obtenido en este trabajo de investigación (8,6 °GL), a pesar que realizaron una corrección del exudado de cacao agregando azúcar, obteniendo un sustrato de 17°Brix, el bajo nivel de °Brix inicial puede ser uno de los factores que generaron el bajo nivel alcohólico obtenido y la composición del exudado utilizado. El tiempo de fermentación fue de 10 días y la inoculación de 0,15 g/l de

S. cerevisiae, tiempo igual a los obtenidos en el T1 y T4 de la presente investigación, pero diferenciándose en la inoculación que posiblemente influyo en la diferenciación de °GL obtenidos.

Por otro lado Alarcon (2013), logro obtener una producción de 14,9 °GL, esta diferencia que reporta es debido a que el utilizo un exudado corregido con azúcar a 22 °Brix, una mayor proporción de inóculo (*S. cerevisiae*) 0,15 g/l y uso de cascarilla de cacao irradiada en una proporción de 50%. Al tener una mayor concentración de levaduras en el sustrato la fermentación se realizó con mayor fuerza y por ende tuvo mayor concentración de alcohol final en 10 días de fermentación.

Goya (2013), obtuvo un máximo rendimiento alcohólico de 15,15 °GL y una mínima de 8,9 °GL, teniendo tiempos de fermentación de 12 y 8 días respectivamente, una inoculación de 1,2 g de levadura para 600 ml de exudado. Siendo el valor de 8,9 °GL el que coincide con los tratamientos T1 y T4 de esta investigación, diferenciándose en el tiempo de fermentación que fue de 10 días, esto se debería a la menor proporción de inóculo el cual fue retribuido al incrementarse el tiempo de fermentación en 2 días para así obtener el mismo rendimiento alcohólico. Otro motivo para la diferencia en el rendimiento alcohólico fue los °Brix del exudado de cacao que inicio con 22 °Brix. Las diferencias que pueden presentar el rendimiento alcohólico de este trabajo de investigación y los reportados en la literatura científicas se pueden deber a las condiciones del proceso de fermentación, los cambios de temperatura, el estado del inóculos (fase exponencial o estacionaria), el estado del exudado del cacao, el agotamiento de un componente del sustrato que limita la fermentación y otros que siempre se presentan en un proceso biológico.

Otro factor que implicó la variación en la producción de alcohol con otros trabajos, es que el exudado de cacao CCN-51 en el presente trabajo fue esterilizado por medio de un autoclave, un proceso térmico severo, con el fin de tener un sustrato estéril. Se conoce que en las condiciones del autoclave, los líquidos como el exudado cacao CCN-51 ricos en azúcares presentan una pirolisis al superar la temperatura de fusión de los azúcares presentes, la reacción se presenta en medios ácidos generando la formación de compuestos de alto peso molecular como caramelana, carameleno y caramelina o humina (Delgadillo s.f.). La presencia de estos nuevos compuestos que no se encontraban en el exudado provoca que las cepas de levaduras nativas se adapten a las nuevas condiciones, frecuentemente sintetizando nuevos enzimas que no eran necesarios previamente, como indica Schlegel (1997), influenciando finalmente en el rendimiento de producción de alcohol. Fue necesario realizar este proceso de autoclavado ya que las concentraciones de los inoculos eran relativamente bajas y el riesgo de interferencia en la fermentación con otros microorganismos eran significativos.

Según nuestros resultados y análisis estadístico se rechazó la hipótesis nula planteada y aceptamos la hipótesis alterna que indica: “Utilizando levaduras nativas aisladas y seleccionadas, no obtendremos mayores rendimientos de producción alcohólica que la *Saccharomyces Cerevisiae* al emplear como sustrato el exudado de cacao (*Theobroma cacao* L.) clon CCN-51.

Cuadro 21. Rendimiento de producción de alcohol utilizando como sustrato exudado de cacao CCN-51 San Alejandro, Ucayali – Perú.

Cepa (tratamiento)	Rendimiento (%) v/v
S. cerevisiae (T1)	8,6 ± 0,057
L1 (T2)	0,6 ± 0,057
L3 (T3)	0 ± 0,0
L4 (T4)	8,6 ± 0,1

Como se aprecia en el cuadro 21 el rendimiento máximo alcanzado por la cepas de levaduras nativas aisladas fue de $8,6 \pm 0,01\%$ v/v (volumen de alcohol/volumen de exudado CCN-51), dicha levadura fue la cepa L4 (T4) que no presenta diferencias estadísticas con la levadura control *S. cerevisiae* (T1). El rendimiento fue mermado por las explicaciones ya mencionadas y que si se optimiza el proceso se podría alcanzar rendimientos más significativos. Es así que la cepa nativa de levadura L4, procedente de la muestra de tierra que se recogió de la parte inferior del cajón fermentador que siempre se enriquece con exudado de cacao en cada fermentación de cacao, es la más adecuada para su utilización en procesos pilotos para brindar valor agregado a exudado de cacao CCN-51.

V. CONCLUSIONES.

Bajo las condiciones del presente trabajo de investigación, se llega a la siguiente conclusión:

1. Se determinó que de las siete cepas de levaduras aisladas solo tres produjeron alcohol, al emplear como sustrato el exudado de cacao CCN-51, siendo la levadura nativa (T4), la cepa que presento una producción alcohólica semejante a la levadura comercial *S. cerevisiae*.

VI. RECOMENDACIONES.

Finalizado el trabajo de investigación se recomienda lo siguiente:

1. Realizar la identificación de la levadura nativa (T4) para su uso posterior en la producción de biocombustibles, vinos, vinagres y otros empleando como materia prima el exudado de cacao.

VII. LITERATURA CITADA.

AGRARIA. 2015. Demanda mundial de cacao ascendería a 5 millones de toneladas en 2020 (en línea, sitio web). Consultado el 11 de agos. 2016. Disponible en <http://www.agraria.pe/noticias/demanda-mundial-de-cacao-ascenderia-a-5-millones-de-tonelada-8385>.

Alarcon, T. 2013. Aprovechamiento de subproductos de cacao CCN-51 para elaboración de bebida alcohólica a partir del exudado de mucilago con adición de cascarillas irradiadas con UV-C (en línea). Tesis Ing. Ali. Quito, Ecuador, Universidad tecnológica Equinoccial. Consultado 14 agos. 2016. Disponible en http://repositorio.ute.edu.ec/bitstream/123456789/5025/1/53147_1.pdf.

Aquiahuatl, R. M., Volke, S. T., Prado, B. L., Shirai, M. K., Ramíres, V. F., y Salazar, G. M. 2012. Manual de prácticas de laboratorio de Microbiología general (en línea). Mexico D.F., Mexico. Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa. Consultado 14 set. de 2016. Disponible en http://www.izt.uam.mx/ceu/publicaciones/MMBG/files/manual_microbiologia_general.pdf.

Barén, C. 2013. Utilización del mucilago de cacao (*theobroma cacao* L.), tipo nacional y CCN-51 en la obtención de dos jaleas a partir de tres formulaciones, Quevedo, Ecuador 2013 (en línea). Tesis Ing. Ali. Quevedo, Ecuador, Universidad Técnica Estatal de Quevedo. Consultado 14 de agos. 2016. Disponible en <http://repositorio.uteq.edu.ec/bitstream/43000/240/1/T-UTEQ-0005.pdf>.

- Bastidas, O. s.f. Conteo Celular con Hematocitómetro (en línea). Technical Note - Neubauer Chamber Cell Counting. Consultado 14 de agos. 2016. Disponible en <http://www.celeromics.com/es/resources/docs/Articles/Conteo-Camara-Neubauer.pdf>.
- Blanco, C. P. s.f. Microorganismos en la industria enológica y su relación con la calidad dle vino (en línea). Estacion de Viticultura y Enología de Galicia. Consultado 24 de agos 2017. Disponible en http://mediorural.xunta.gal/fileadmin/arquivos/investigacion/transferecia_tecnologica/calidademb.pdf.
- Camacho, A., Giles, M., Ortégón, A., Palao, M., Serrano, B., y Velásquez, O. 2009. Preparación y dilución de muestras de alimentos para su análisis microbiológicos (en línea). UNAM. Consultado 15 agos. 2016. Disponible en http://depa.fquim.unam.mx/amyd/archivero/TecnicBasic-Diluciones_6526.pdf.
- Copper-Smith. 2016. Tabla de corrección de la temperatura del alcohol (en linea, sitio web) . Consultado 5 novi. 2017. Destilarias Eau.de.Vie Iverian Coppers S.A. Disponible en <https://www.copper-alembic.com/es/pagina/tabla-de-correccion-de-la-temperatura-del-alcohol>.
- Cousco, S. 2012. Determinacion de alcoholes en vinos (en línea, sitio web). Analisis Qumicousc.blogost. consultado 14 agos. 2016. Disponible en <http:// analisisquimicousc.blogspot.pe/2010/04/metodos-para-la-determinacion-de-etanol.html>.

- Delgadillo, G. O. s.f. Caramelización (en línea). Mexico D.F. Universidad Nacional Autónoma de México. Consultado 28 agos. 2017. Disponible en http://depa.fquim.unam.mx/amyd/archivero/Seminario-Caramelizacion_27353.pdf.
- Díaz, N., y Clotet, R. 1995. Cinética de la caramelización en soluciones azucaradas simples (en línea). Revista de Alimentari: 35-38. Consultado 25 agos. 2017. Disponible en http://depa.fquim.unam.mx/amyd/archivero/CinetCaramelizacion_1821.pdf.
- Fajardo, C. E., y Sarmiento, F. S. 2007. Evaluación de melaza de caña como sustrato para la producción de *Saccharomyces cerevisiae* (en línea). Tesis Micr. Bogotá, Argentina. Pontificia Universidad Javeriana. Consultado 12 oct. 2016. Disponible en <http://www.javeriana.edu.co/biblos/tesis/ciencias/tesis26.pdf>.
- GAB Sistemática Analítica S.L. s.f. Cámara Thoma y Neubauer Improved para el recuento de levaduras (Tiraje) (en línea). Gabsystem.com. Consultado 5 nov. 2017. Disponible en http://shop.gabsystem.com/data/descargas/Camara%20Thoma%20Neubauer_SP.pdf.
- Garzón, C. S., y Hernández, L. C. 2009. Estudio comparativo para la producción de etanol entre *Saccharomyces Cerevisiae* silvestre, *Saccharomyces Cerevisiae* ATCC 9763 y *Candida utilis* ATCC 9950 (en línea). Tesis Micr. Pereira, Colombia. Universidad Tecnológica de Pereira. Consultado 14 de ago. 2016. Disponible en

<http://repositorio.utp.edu.co/dspace/bitstream/handle/11059/1689/66182G245.pdf;jsessionid=E54720135D433875356DCE6D96D2E279?sequence=1>.

Goya, M. 2013. Obtención de una bebida alcohólica a partir de mucílago de cacao mediante fermentación anaerobia en diferentes tiempos de inoculación (en línea). Tesis Ing. Agr. Quevedo, Ecuador. Universidad Técnica de Quevedo. Consultado 14 ago. 2016. Disponible en <http://repositorio.uteq.edu.ec/bitstream/43000/336/1/T-UTEQ-0011.pdf>.

INEI (Instituto Nacional de Estadística e Informática). 2017. Producción de cacao Ucayali (en línea, sitio web). Consultado 28 jun. 2017. Disponible en <http://www.inei.gob.pe>.

INTAGRI S.C. 2017. Propiedades físicas del suelo y el crecimiento de las plantas (en línea, sitio web). Consultado 5 nov. 2017. Disponible en <https://www.intagri.com/articulos/suelos/propiedades-fisicas-del-suelo-y-el-crecimiento-de-las-plantas>

Loayza, M. 2014. Influencia de la frecuencia de remoción, durante la fermentación, en la calidad sensorial del cacao (*Theobroma Cacao*, L.) de Satipo (en línea). Tesis Ing. Agr. Lima, Perú. Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Consultado 14 ago. 2016. Disponible en http://cybertesis.unmsm.edu.pe/bitstream/cybertesis/3877/1/Loayza_lw.pdf.

Lozano, U. L., Romero, B. A., y Urbina, G. J. 2013. Manual de prácticas del laboratorio I de química orgánica (en línea). Universidad Industrial de Santander. Consultado 15 de jun. 2016. Disponible en

http://matematicas.uis.edu.co/9simposio/sites/default/files/V01Man07Orgal_MFOQ-OR.01_08072013.pdf.

Madigan, T. M., Martinko, M. J., Dunlap, V. P., y Clark, P. D. 2009. Brock biología de los microorganismos. Madrid, España. Ed 12. Edit. Pearson addison wesley.

Márquez y Salazar. 2015. Análisis de los niveles de desperdicio del mucilago de cacao y su aprovechamiento como alternativa de biocombustible (en línea). Tesis Ing. Ind. Milagro, Ecuador. Universidad Estatal de Milagro. Consultado 14 ago. 2016. Disponible en <http://repositorio.unemi.edu.ec/bitstream/123456789/1770/1/An%C3%A1lisis%20de%20los%20niveles%20de%20desperdicio%20del%20muc%C3%ADlago%20de%20cacao%20y%20su%20aprovechamiento%20como%20alternativa%20de%20biocombustible.pdf>.

MINAGRI (Ministerio de Agricultura y riego). 2016. Anuario estadístico de la producción agrícola y ganadera 2015 (en línea). Lima, Perú. 302 p. Consultado 25 abr. 2017. Disponible en http://siea.minagri.gob.pe/siea/sites/default/files/anuario_produccion_agricola_ganadera2015.pdf.

Ortiz, E. 2013. Aislamiento, selección e identificación de levaduras enológicas nativas no-Saccharomyces en viñedos establecidos en Querétaro (en línea). Tesis Mg. Querétaro, México. Universidad Autónoma de Querétaro. Consultado 14 ago. 2016. Disponible en <http://ri.uaq.mx/bitstream/123456789/1609/1/RI001083.pdf>.

- Owen, P. W. 1991. Biotecnología de la fermentación Principios, procesos y productos. (M. C. Rebollar, Trad.) Zaragoza, España. Edit. ACRIBIA, S.A.
- Perez, Y. 2012. Medio de cultivo para hongos: Agar PDA (en línea, sitio web). Blog Naturaleza. Consultado 5 nov. 2017. Disponible en <http://www.blog.naturaleza.eldietista.es/2012/01/medio-de-cultivo-para-hongos.html>.
- Quimbita, F., Rodriguez, P., y Vera, E. 2013. Uso del exudado y placenta de cacao para la obtencion de subproductos (en línea). Revista tecnológica ESPL-RTE, 26(1): 8-15. Consultado 15 ago. 2017. Disponible en <http://www.rte.espol.edu.ec/index.php/tecnologica/article/view/272/193>.
- Sánchez, M. A. 2011. Fermentación de malta empleando un sistema semicontinuo en el proceso de elaboracion de cerveza (en línea). Tesis Ing. Ali. Oaxaca. Universidad tecnologica de Mixteca. Consultado 04 oct. 2016. Disponible en http://jupiter.utm.mx/~tesis_dig/11360.pdf.
- Schlegel, G. H. 1997. Microbiología general. Barcelona, España. Edit. Omega S.A.
- Vanegas, M y Zapata, M. 2009. Aislamiento de levaduras capaces de producir alcohol a partir de macrofitas acuaticas extraidas mecanicamente de la laguna de Fuquene (en línea). Tesis Micr. Ind. Bogota, Argentina. Ponteficie Universidad Javerina. Consultado 14 ago. 2016. Disponible en <http://www.javeriana.edu.co/biblos/tesis/ciencias/tesis408.pdf>.
- Villagómes, G. S., y Argüello, M. F. 2013. Optimización y aprovechamiento del residuo (exudado del mucilago de cacao) de la almendra fresca de cacao (Theobroma cacao L.) CCN-51 en la elaboración de vinagre (en línea).

Revista Tsafiqui 4: 7-19. Consultado 5 nov. 2017. Disponible en <https://revistas.ute.edu.ec/index.php/tsafiqui/article/view/256/260>.

Wacher, R. M. 2011. Microorganismos y chocolate. Universidad Nacional Agraria la Molina (en línea). Lima: Coordinación de publicaciones digitales - UNAM. Consultado 12 ago. 2016. Disponible en <http://www.revista.unam.mx/vol.12/num4/art42/index.html>.

VIII. ANEXO.

ANEXO 1.

**DISTRIBUCIÓN DE LAS UNIDADES EXPERIMENTALES CON DCA Y
ANÁLISIS PARAMÉTRICO DE VARIABLES EN ESTUDIO.**

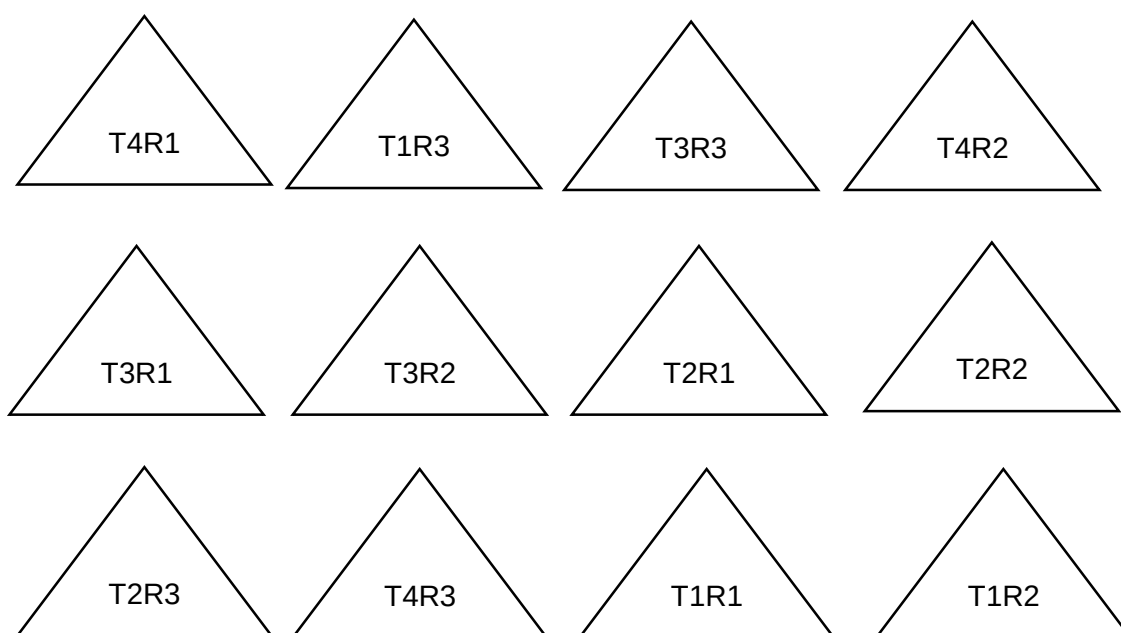


Figura 12A. Distribución de las unidades experimentales con DCA.

Cuadro 22A. ANVA de producción alcohólica °GL en la fermentación de exudado de cacao CCN-51.

ANVA					
Producción alcohólica					
	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	207,343	3	69,114	16587,467	0,000
Dentro de grupos	0,033	8	0,004		
Total	207,377	11			

Cuadro 23A. Prueba Dunnett para la producción alcohólica °GL en la fermentación de exudado de cacao CCN-51.

Comparaciones múltiples						
Variable dependiente: Producción alcohólica (°GL)						
T de Dunnett (bilateral) ^a						
(I) Levaduras seleccionadas	(J) Levaduras seleccionadas	Diferencia de medias (I-J)	Error estándar	Sig.	Intervalo de confianza al 95%	
					Límite inferior	Límite superior
L1	S. cerevisiae	-8,00000*	0,0527 0	0,0 00	-8,1518	-7,8482
L3	S. cerevisiae	-8,66667*	0,0527 0	0,0 00	-8,8184	-8,5149
L4	S. cerevisiae	-0,06667	0,0527 0	0,4 84	-,2184	0,0851

*. La diferencia de medias es significativa en el nivel 0.05.

a. Las pruebas t de Dunnett tratan un grupo como un control, y comparan todos los demás grupos con este.

Cuadro 24A. ANVA para el consumo de °Brix en la fermentación de exudado de cacao CCN-51.

ANVA					
Consumo de °Brix					
	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	228,469	3	76,156	10154,185	0,00 0
Dentro de grupos	0,060	8	0,008		
Total	228,529	11			

Cuadro 25A. Prueba Dunnett para el consumo de °Brix en la fermentación de exudado de cacao CCN-51.

Comparaciones múltiples						
Variable dependiente: Consumo de °Brix						
T de Dunnett (bilateral) ^a						
(I) Levaduras seleccionadas	(J) Levaduras seleccionadas	Diferencia de medias (I-J)	Error estándar	Sig.	Intervalo de confianza al 95%	
					Límite inferior	Límite superior
L1	S. cerevisiae	- 7,83333*	0,0707 1	0,0 00	-8,0370	-7,6297
L3	S. cerevisiae	- 9,46667*	0,0707 1	0,0 00	-9,6703	-9,2630
L4	S. cerevisiae	0,00000	0,0707 1	1,0 00	-0,2036	0,2036

*. La diferencia de medias es significativa en el nivel 0.05.

a. Las pruebas t de Dunnett tratan un grupo como un control, y comparan todos los demás grupos con este.

Cuadro 26A. ANVA en la concentración celular final en la fermentación de exudado de cacao CCN-51.

ANVA					
Concentración celular final (células/ml)					
	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	81347111000 0000000,000	3	27115703670 0000000,000	1,423	0,306
Dentro de grupos	15246764020 00000000,000	8	19058455020 0000000,000		
Total	23381475120 00000000,000	11			

Cuadro 27A. Prueba Dunnett para la concentración celular (células/ml) en la fermentación de exudado de cacao CCN-51.

Comparaciones múltiples						
Variable dependiente: Concentración celular final (células/ml)						
T de Dunnett (bilateral)^a						
(I) Levaduras seleccionadas	(J) Levaduras seleccionadas	Diferencia de medias (I-J)	Error estándar	Sig.	Intervalo de confianza al 95%	
					Límite inferior	Límite superior
L1	S. cerevisiae	- 36500000,00 000	356449669,4000 0	0,99 9	- 1062954418,000 0	989954418,3 000
L3	S. cerevisiae	- 110600000,0 0000	356449669,4000 0	0,97 9	- 1137054418,000 0	915854418,3 000
L4	S. cerevisiae	545166666,7 0000	356449669,4000 0	0,34 9	- 481287751,6000	1571621085, 0000

a. Las pruebas t de Dunnett tratan un grupo como un control, y comparan todos los demás grupos con este.

Cuadro 28A. ANVA en el tiempo de fermentación del exudado de cacao CCN-51.

ANVA					
Tiempo de fermentación (h)					
	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	89816,250	3	29938,750	42,949	0,000
Dentro de grupos	5576,667	8	697,083		
Total	95392,917	11			

Cuadro 29A. Prueba de Dunnett para el tiempo de fermentación del exudado de cacao CCN-51.

Comparaciones múltiples						
Variable dependiente: Tiempo de fermentación						
T de Dunnett (bilateral)^a						
(I) Levadur as seleccio nadas	(J) Levaduras selecciona das	Diferencia de medias (I-J)	Error estándar	Sig.	Intervalo de confianza al 95%	
					Límite inferior	Límite superior
L1	S. cerevisiae	-65,33333*	21,55742	0,040	-127,4114	-3,2553
L3	S. cerevisiae	-229,33333*	21,55742	0,000	-291,4114	-167,2553
L4	S. cerevisiae	-46,33333	21,55742	0,147	-108,4114	15,7447

*. La diferencia de medias es significativa en el nivel 0.05.

a. Las pruebas t de Dunnett tratan un grupo como un control, y comparan todos los demás grupos con este.

ANEXO 2.

SIEMBRA POR EL MÉTODO DE ESTRIBADO.

El aislamiento de levaduras a partir de muestras naturales se realiza mediante la técnica de estría cruzada para producir colonias aisladas en cultivos sólidos y así, obtener un cultivo puro o axénico (cepa). Cuando la técnica por estría se aplica para aislar un microorganismo de interés a partir de mezclas donde se encuentra en pequeñas cantidades, generalmente se obtendrán las bacterias dominantes. En este caso, se utilizan medios selectivos o de enriquecimiento, los que contienen nutrientes especiales, antibióticos, altas concentraciones de sales y/o condiciones de pH, luz o temperatura que incrementaran la población del microorganismo de interés y se facilitara su aislamiento. A continuación se describe el procedimiento:

- A. Dividir cada una de las cajas Petri por la parte de atrás en cuatro cuadrantes. Esterilizar el asa con calor en el mechero.
- B. Dejar enfriar el asa y tomar la muestra de una colonia.
- C. Inocular la muestra haciendo 4 o 5 estrías simples muy juntas de lado a lado sobre el primer cuadrante de la caja, cerrar la caja. Flamear el asa de inoculación y hacer girar la caja Petri un cuarto de vuelta.
- D. Abrir nuevamente la caja y con el asa de siembra esterilizada y fría, tocar la superficie del de estrías recién hechas en un punto alejado del inicio. Hacer un segundo grupo de estrías como en el caso anterior. Realizar el mismo procedimiento en el tercer cuadrante y en el último cuadrante, sin flamear el asa de siembra hará una estría más abierta (simple).
- E. Las cajas con la base hacia arriba se incuban a 35 °C durante 24-48 horas.

Fuente: Aquiahuatl *et al.* (2012).

ANEXO 3.

ELABORACIÓN DE MEDIO YPD.

El medio YPD se puede presentar en dos estados, sólido y líquido. Este es un medio selectivo para aislamiento de levaduras. Su preparación consiste en disolver los componentes en agua destilada, posteriormente esta solución tiene que homogenizar, esto se logra en baño maría, y para posteriormente autoclavar. Para suprimir el crecimiento bacteriano algunas veces es deseable acidificar el medio a pH 3.5. Esto se puede conseguir adicionando 1 ml de ácido láctico al 10% por cada 100 ml del medio estéril y a 50°C. El medio no debe de ser calentado después de la adición del ácido, ya que esto podría hidrolizar el agar alterando su propiedad gelificante.

Componentes del medio YPD.

Extracto de levadura	10 g
Peptona	20 g
Glucosa	20 g
Agua destilada hasta	1 L
Cloranfenicol	0.5 g

Para la preparación de medio solido se añade agar (20 g/L).Esterilizar en autoclave a 121°C durante 15 min.

Fuente: Vanegas y Zapata (2009).

ANEXO 4.

ELABORACIÓN DE MEDIO PDA.

El Agar Papa Dextrosa o Agar PDA es un medio sencillo que incluye dextrosa e infusión de patata blanca (*Solanum tuberosum*). En este medio, los hongos crecen y se reproducen muy fácilmente. Puede añadirse ácido tartárico, ácido clorhídrico o ácido láctico al 10% para bajar el pH hasta 3.5 e inhibir el crecimiento bacteriano. También pueden añadirse pequeñas proporciones (50-200 ppm) de antibióticos como cloranfenicol, que resiste bastante bien la esterilización, eritromicina o penicilina.

Material Necesario.

- Olla, cazuela, 1500 ml de agua destilada, 200-250 g de Patata, 13-18 g de Agar y 13 – 20 g de Dextrosa.

Preparación.

Tomar 500 ml de agua destilada y cocer en ella una patata de 200 g pelada y cortada en trozos. En otro recipiente disolver el agar en 500 ml de agua destilada al fuego. Colar la infusión de patata a través de un colador de algodón o un colador chino, mezclar ambos líquidos, agregar la dextrosa, homogeneizar. Enrasar a 1000 ml (ya que parte se habrá evaporado y ya no tendremos un litro).

El pH resultante suele ser de 5.6. Lo mejor es verterlo directamente en los botes que utilizaremos para hacer la siembra de los hongos y esterilizarlos. Se dejan enfriar y se cierran bien los botes hasta su utilización.

Fuente: Perez (2012).

ANEXO 5.

USO DE CÁMARA NEUBAUER.

Preparación de la muestra:

1. Lavar la cámara y el cubre con agua destilada y alcohol 96%.
2. Secar bien con papel suave.
3. Poner el cubreobjetos encima de la cámara.
4. Homogeneizar removiendo bien el cultivo en donde residen las levaduras.
5. Tomar con pipeta una muestra.
6. Poner la punta de la pipeta en una de las dos ranuras de la cámara y, por capilaridad, las levaduras se distribuirán en la cámara.
7. Si se crea una cámara de aire repetir la operación desde el principio.
8. Fijar la cámara de recuento en la platina del microscopio para realizar la observación microscópica.
9. Esperar unos minutos antes de contar para que las levaduras se depositen en la cámara.

Preparativos del microscopio:

El enfoque del microscopio se empieza con el objetivo de menor aumento que posteriormente pasaremos a uno de más. Se centra el objetivo del microscopio a ojo en el centro teórico de la cruz de la cámara, luego se coloca el objetivo lo más cerca posible del cubreobjetos pero sin tocarlo y posteriormente se irá alejándolo hasta que la imagen sea lo más clara y nítida posible. Se aconseja trabajar a 400 aumentos. Contabilizar levaduras totales (recuento en los cuadrantes rojos):

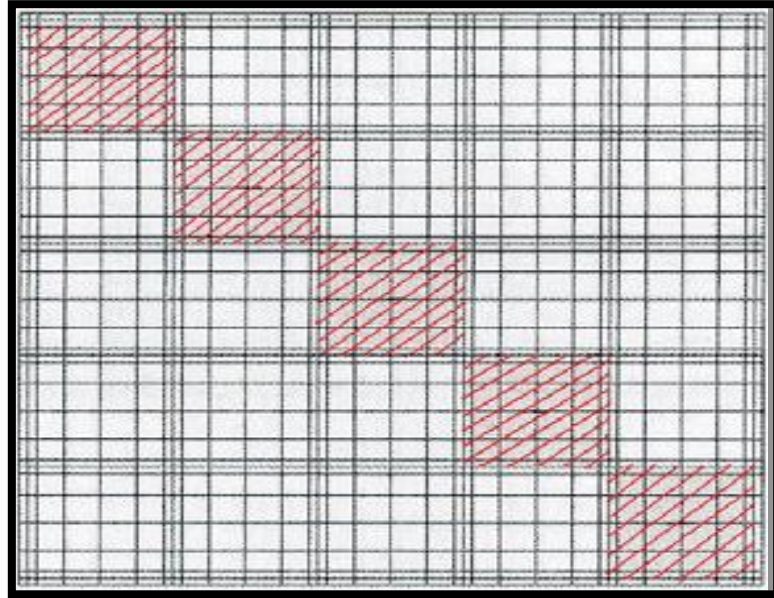


Figura 13A. Forma de contar levaduras en cámara Neubauer.

Con el conteo total se obtiene el promedio y luego se aplica el resultado con la formula mostrada en la metodología.

Fuente: GAB Sistemática Analítica S.L. (s.f.).

ANEXO 6.

ELABORACIÓN DE FERMENTADORES.

Para la fermentación de caldo YPD se utilizó matraces de 125 ml, para mantener las condiciones anaerobias se utilizó como tapón corchos a los cuales se les realizó una perforación en la parte central en donde se colocó una manguera a presión para la purga de CO_2 que terminaba en un recipiente con agua. Para el caso de la fermentación de exudado de cacao, se empleó como fermentador botellas Pírex de laboratorio de 500 ml, a los corchos se tuvieron que hacer dos agujeros, para el ingreso de dos mangueras de diámetro 3,5 mm, una para la purga de CO_2 y la otra para la toma de muestras. Se utiliza ligas para asegurar las condiciones anaerobias del fermentador. Los corchos, mangueras, ligas y matraces fueron esterilizados.

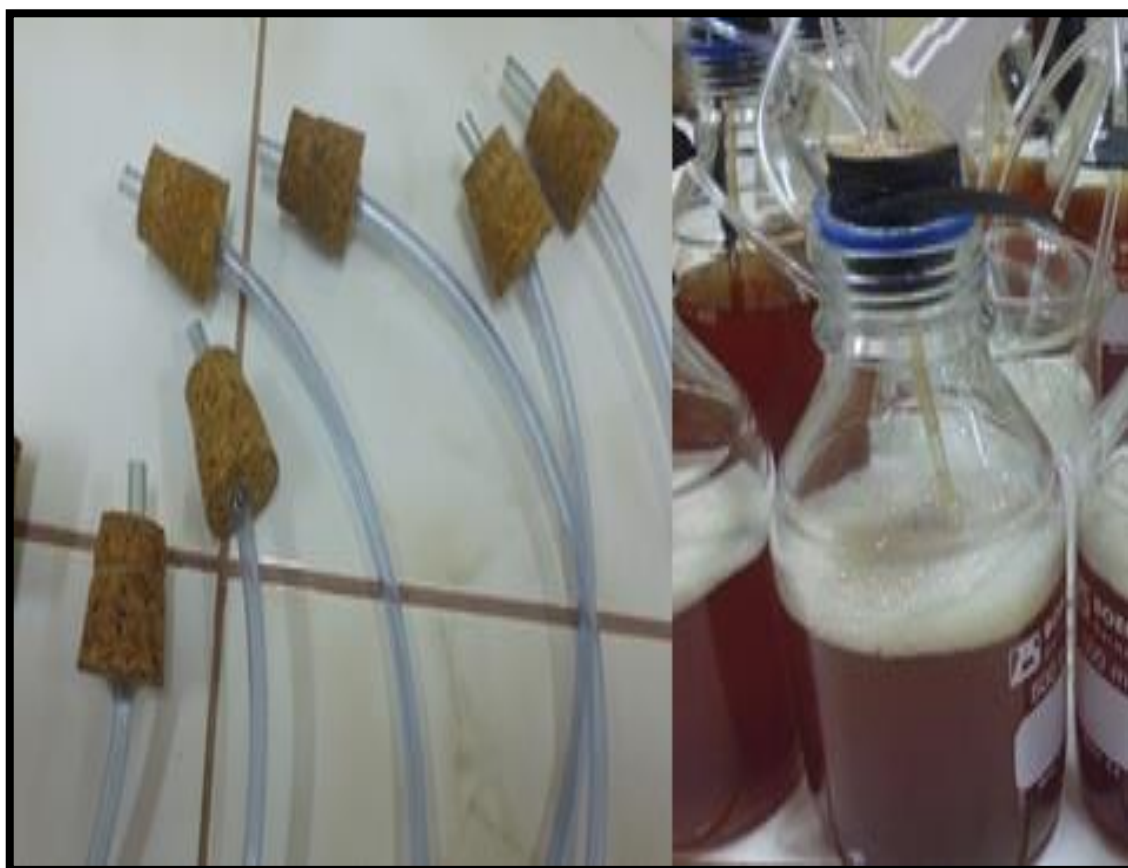


Figura 14A. Corchos y fermentador de exudado.

ANEXO 7.

PRUEBA DE YODOFORMO.

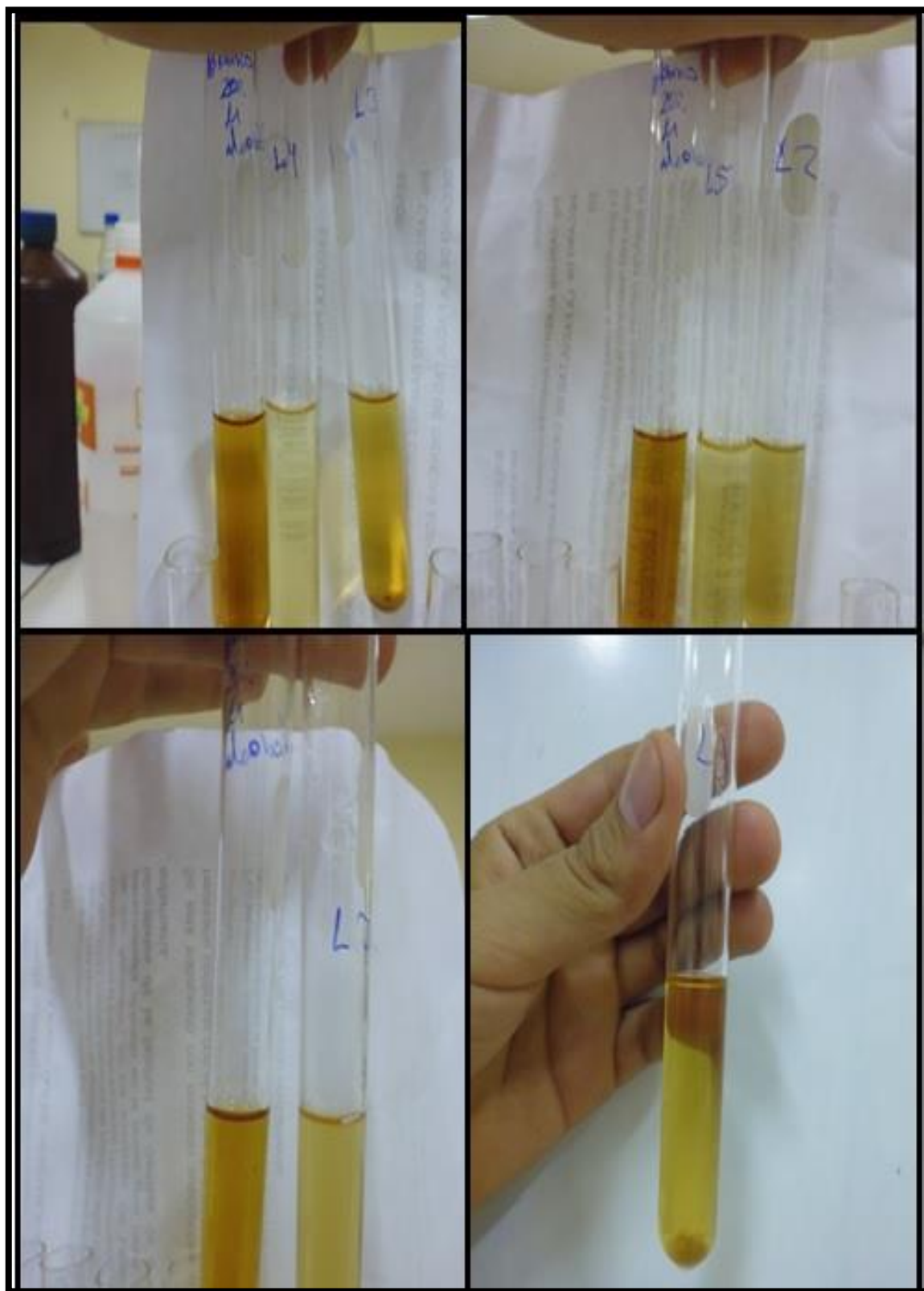


Figura 15A. Tubos de prueba de yodoformo comparados con el blanco.

ANEXO 8.

ANÁLISIS QUÍMICO PROXIMAL DE EXUDADO DE CACAO CCN-51.

Natura Analítica SAC
RUC: 20600103661
SECCIÓN II:
ANÁLISIS DE AGUAS Y ALIMENTOS

CERTIFICADO DE ANALISIS N° 20170806

SOLICITANTE	ELVIS JHONATAN VILA AVENDAÑO
R.U.C.	48181998
RESPONSABLE:	ELVIS JHONATAN VILA AVENDAÑO
MUESTRA	EXUDADO DE CACAO
PROCEDENCIA DE LA MUESTRA	KM 130 CASERIO SAN JUAN BAUTISTA
FORMA Y PRESENTACIÓN	01 Botella de plástico
CANTIDAD RECIBIDA	2 L aprox.
ANALISTA RESPONSABLE	Blgo. Fredi Carrasco S.
FECHA DE INGRESO	07/08/2017
COLECTOR	ELVIS JHONATAN VILA AVENDAÑO
ANÁLISIS SOLICITADOS	BROMATOLÓGICO PROXIMAL
FECHA INICIO DE ENSAYO	07/08/2017
FECHA TERMINO DE ENSAYO	17/08/2017
FECHA EMISIÓN DE RESULTADOS	17/08/2017

* El laboratorio se hace responsable de la muestra a partir de la recepción

**RESULTADOS
ANÁLISIS FÍSICOQUÍMICO**

PARÁMETRO	UNIDADES	MÉTODO	RESULTADO
Proteínas	mg/100 g	Kjeldahl Method	0,18
Humedad	%	Aire Seco	85,76
Cenizas	%	Método Gravimétrico	0,82
Carbohidratos	mg/100 g	Metodo Indirecto	0,69
Grasas	mg/100 g	Extracción	0,97

UMT = Unidad rutinaria de toxicidad



Av. Sáenz Peña N° 503
Teléfono: 576080



Natura Analítica S.A.C.
Blgo. Fredi A. Carrasco Sandoval
C.R. 2530
GERENTE TÉCNICO

1 de 1

av. Sáenz Peña 503 PUCALLPA teléfono: 576060 E-MAIL: naturaanalitica@gmail.com

ANEXO 9.
FOTOS DEL TRABAJO EN CAMPO Y LABORATORIO



Figura 16A. Recolección de muestras en el área de fermentación de cacao CCN-51.



Figura 17A. Trabajo de aislamiento en laboratorio.

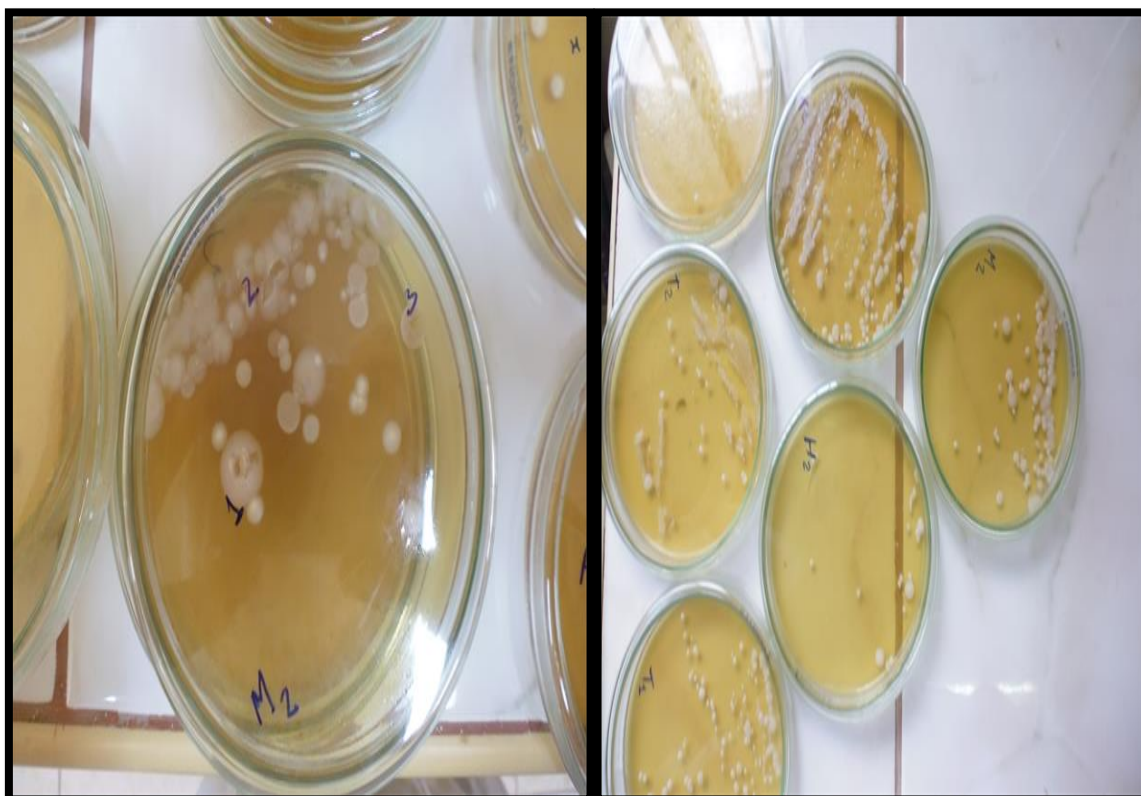


Figura 18A. Levaduras sembradas por estría en medio YPD.

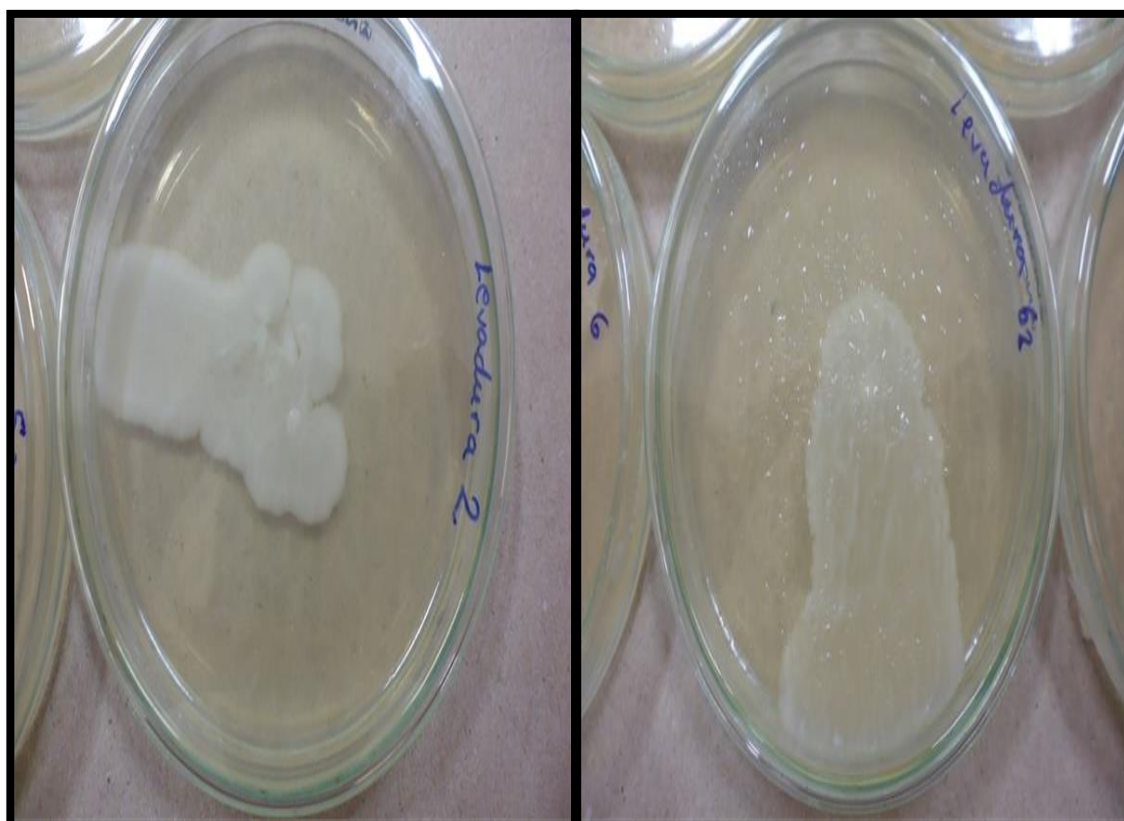


Figura 19A. Cepas de levaduras nativas en medio PDA.



Figura 20A. Levaduras en medio líquido (caldo YPD).



Figura 21A. Microscopia cepa L4 (izquierda) y cepa L3 (derecha) en cámara Neubauer.



Figura 22A. Fermentación de caldo YPD y exudado de cacao CCN-51 autoclavado con las cepas aisladas.



Figura 23A. Refractómetro digital y lectura de °GL en el alcoholímetro.