



**UNIVERSIDAD TECNOLÓGICA EQUINOCCIAL**

**FACULTAD DE CIENCIAS DE LA INGENIERÍA  
CARRERA DE INGENIERÍA DE ALIMENTOS**

**OPTIMIZACIÓN Y APROVECHAMIENTO DEL RESIDUO  
(EXUDADO DEL MUCÍLAGO) DE LA ALMENDRA FRESCA  
DEL CACAO (*Theobroma cacao L.*) CCN51 EN LA  
ELABORACIÓN DE VINAGRE**

**TRABAJO PREVIO A LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO DE INGENIERO DE  
ALIMENTOS**

**SEBASTIÁN VILLAGÓMEZ GARCÍA**

**DIRECTORA: ING. YOLANDA ARGUELLO**

**QUITO, MARZO, 2013.**

© Universidad Tecnológica Equinoccial, AÑO 2013  
Reservados todos los derechos de reproducción

# DECLARACIÓN

Yo **SEBASTIÁN VILLAGÓMEZ GARCÍA**, declaro que el trabajo aquí descrito es de mi autoría; que no ha sido previamente presentado para ningún grado o calificación profesional; y, que he consultado las referencias bibliográficas que se incluyen en este documento.

La Universidad Tecnológica Equinoccial puede hacer uso de los derechos correspondientes a este trabajo, según lo establecido por la Ley de Propiedad Intelectual, por su Reglamento y por la normativa institucional vigente.

---

Sebastián Villagómez García

C.I. 172387625-4

# CERTIFICACIÓN

Certifico que el presente trabajo que lleva por título “**Optimización y aprovechamiento del residuo (exudado del mucílago) de la almendra fresca del cacao (Theobroma cacao L.) ccn51 en la elaboración de vinagre**”, que, para aspirar al título de **Ingeniero en alimentos** fue desarrollado por **Sebastián Villagómez García**, bajo mi dirección y supervisión, en la Facultad de Ciencias de la Ingeniería; y cumple con las condiciones requeridas por el reglamento de Trabajos de Titulación artículos 18 y 25.

---

Ing. Fanny Yolanda Arguello  
DIRECTOR DEL TRABAJO  
C.I. 180162646-4

El presente trabajo de investigación es realizado en el desarrollo del Proyecto IV.UIO.ING.23 de la Facultad de Ciencias de la Ingeniería que se titula: "Optimización de desechos de la agroindustria del cacao CCN-51 en la elaboración de vino, vinagre y semillas productivas para su cultivo", IV Convocatoria de Proyectos de Investigación Científica de la Universidad Tecnológica Equinoccial.

## **AGRADECIMIENTO**

A mi madre, por ser mi fuerza, ejemplo y aliciente para seguir adelante, así como ser un pilar en mi crecimiento y contribuir a mi desarrollo personal.

A mi padre por ayudarme a crecer y culminar mis estudios, a la vez que supo guiarme y darme las herramientas para crecer como ser humano.

Profesores, amigos y familiares, que me apoyaron para culminar mis metas propuestas.

A la Ingeniera Fanny Yolanda Argüello por permitirme ser parte de una parte del proyecto de investigación y por toda la paciencia y guía para culminar este trabajo.

A la Universidad Tecnológica Equinoccial por la formación académica y por darme la oportunidad de convertirme en un profesional y ser un aporte útil a la sociedad con mis conocimientos.

A la Facultad de Ciencias de la Ingeniería y todos los colaboradores por apoyarme y brindarme las facilidades, herramientas y guías para culminar mis estudios.

## **DEDICATORIA**

A todos los involucrados en este proceso que culmina de manera exitosa el día de hoy, a mis padres por educarme con sabiduría para conseguir con esfuerzo lo que me propongo; a mis hermanos por ser un pilar para mi esfuerzo, a todos mis amigos y mi novia que sin darse cuenta muchas veces, me apoyaron trascendentalmente en este proceso.

A la Facultad Ciencias de la Ingeniería, a todos los profesores que me ayudaron con el presente trabajo de investigación, en especial a la Ing. Yolanda Argüello que me permitió ser parte del proyecto.

# ÍNDICE DE CONTENIDOS

	<b>PÁGINA</b>
<b>RESUMEN</b> .....	xiv
<b>ABSTRACT</b> .....	xvi
<b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....	1
<b>2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA</b> .....	4
2.1. EL CACAO .....	4
2.1.1. VARIEDADES.....	5
2.1.2. CRIOLLO .....	5
2.1.3. FORASTERO.....	5
2.1.4. TRINITARIO.....	6
2.1.5. NACIONAL DEL ECUADOR.....	6
2.1.6. CCN-51 .....	7
2.1.7. CACAO EN EL MUNDO .....	8
2.1.8. CACAO EN EL ECUADOR.....	9
2.2. MUCÍLAGO .....	10
2.3. VINAGRE .....	11
2.3.1. ANTECEDENTES HISTÓRICOS.....	11



2.3.2.	DEFINICIÓN .....	12
2.3.3.	MADRE DEL VINAGRE .....	12
2.3.4.	TIPOS DE VINAGRE .....	13
2.4.	FERMENTACIÓN ALCOHÓLICA.....	14
2.4.1.	DEFINICIÓN .....	14
2.5.	FERMENTACIÓN ÁCIDO ACÉTICA.....	15
2.5.1.	FERMENTACIÓN SUMERGIDA.....	16
2.5.2.	MÉTODO ORLEANS.....	17
2.5.3.	MÉTODO LUXEMBURGUES .....	19
2.6.	CONDICIONES ÓPTIMAS DE FERMENTACIÓN ACÉTICA.....	20
2.6.1.	INFLUENCIA DE LA TEMPERATURA .....	20
2.6.2.	INFLUENCIA DE LA AGITACIÓN.....	21
2.6.3.	INFLUENCIA DE LA AIREACIÓN.....	21
2.7.	MICROORGANISMOS RESPONSABLES DE LA FERMENTACIÓN ACÉTICA.....	22
2.7.1.	ORGANISMOS INICIADORES DE LA PRODUCCIÓN DE VINAGRE.....	22
2.7.2.	GENERALIDADES DE LAS BACTERIAS ÁCIDO LÁCTICAS EN FERMENTACIONES ACÉTICAS.....	24
2.7.3.	BACTERIAS ACÉTICAS Y CONDICIONES DEL PROCESO ..	25
2.8.	COMPUESTOS AROMÁTICOS EN VINAGRE .....	26

<b>3. METODOLOGÍA</b> .....	27
3.1. OBTENCIÓN DE LA MATERIA PRIMA .....	27
3.2. MÉTODO DE EXTRACCIÓN DEL EXUDADO DEL MUCÍLAGO DE CACAO .....	28
3.2.1. SELECCIÓN .....	30
3.2.2. PESAJE .....	30
3.2.3. LAVADO Y DESINFECCIÓN .....	30
3.2.4. CORTE .....	30
3.2.5. SEPARACIÓN DE ALMENDRAS MUCILAGINOSAS Y PLACENTA.....	31
3.3. ANÁLISIS FÍSICOQUÍMICO DEL EXUDADO DEL MUCÍLAGO DE CACAO .....	31
3.4. FERMENTACIÓN ALCOHÓLICA.....	32
3.4.1. ADECUACIÓN Y FORMULACIÓN DEL MOSTO PARA LLEVAR A CABO LA FERMENTACIÓN ALCOHÓLICA .....	32
3.5. ELABORACIÓN DEL VINO DEL MUCÍLAGO DE CACAO .....	33
3.5.1. ACONDICIONAMIENTO DE MOSTOS .....	34
3.5.2. SULFITADO.....	35
3.5.3. INOCULACIÓN.....	35
3.5.4. FERMENTACIÓN .....	35
3.5.5. TRASIEGO .....	35

3.5.6. ENVASADO.....	36
3.6. CARACTERIZACIÓN FÍSICO-QUÍMICA DEL VINO DE CACAO ...	36
3.7. OBTENCIÓN CULTIVO MADRE PARA SU UTILIZACIÓN COMO INÓCULO.....	37
3.8. ELABORACIÓN DE VINAGRE DE FERMENTACIÓN ACÉTICA DEL VINO DEL EXUDADO DEL MUCÍLAGO DEL CACAO.....	38
3.8.1. INOCULACIÓN.....	40
3.8.2. ADECUACIÓN.....	40
3.8.3. MEDICIÓN.....	40
3.8.4. FERMENTACIÓN.....	41
3.8.5. TRASIEGO.....	41
3.8.6. ENVASADO.....	41
3.8.7. PASTEURIZADO.....	41
3.9. ACETIFICADOR EXPERIMENTAL.....	42
3.9.1. MATRAZ ERLLENMEYER.....	43
3.9.2. MOTOR DE AGITACIÓN.....	43
3.9.3. AGITADOR.....	43
3.9.4. SERPENTÍN DE ENFRIAMIENTO.....	44
3.9.5. BOMBA DE OXÍGENO.....	44
3.9.6. BOMBA DE AGUA.....	44
3.9.7. TEMPERATURA.....	45

3.10. DISEÑO EXPERIMENTAL.....	45
3.11. CARACTERIZACIÓN FÍSICO QUÍMICA DEL SUSTRATO (VINO DEL MUCÍLAGO DEL CACAO). .....	46
3.12. LEVANTAMIENTO DE DATOS DE LA FERMENTACIÓN ACÉTICA DEL VINO DEL MUCÍLAGO DEL CACAO.....	47
3.12.1. DETERMINACIÓN DE ACIDEZ.....	47
3.12.2. DETERMINACIÓN PH.....	48
3.12.3. DETERMINACIÓN DE ETANOL.....	48
3.13. ANÁLISIS SENSORIAL DEL VINAGRE DEL VINO DEL CACAO ..	48
<b>4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....</b>	<b>50</b>
4.1. CARACTERIZACIÓN FÍSICO QUÍMICA DEL CACAO .....	50
4.2. CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS DEL EXUDADO DEL MUCÍLAGO DE CACAO .....	50
4.3. EXTRACCIÓN Y ACONDICIONAMIENTO DEL LÍQUIDO DEL MUCÍLAGO DEL CACAO .....	51
4.4. ELABORACIÓN DEL MOSTO PARA LA FERMENTACIÓN ALCOHÓLICA .....	52
4.5. FERMENTACIÓN DEL VINO DE CACAO CCN-51 .....	53
4.6. CARACTERIZACIÓN FÍSICO-QUÍMICA DEL SUSTRATO .....	54
4.7. OBTENCIÓN DEL CULTIVO MADRE DEL VINAGRE.....	54

4.8. ADECUACIÓN DEL INÓCULO PARA SU UTILIZACIÓN COMO CULTIVO SUMERGIDO.....	55
4.9. ACOMPLAMIENTO DEL SUSTRATO CON EL CULTIVO SUMERGIDO .....	55
4.9.1. MEDICIÓN DE PH .....	56
4.9.2. MEDICIÓN ACIDEZ DEL SUSTRATO CON INOCULO .....	56
4.9.3. ADAPTACIÓN DE LAS CONDICIONES DE FERMENTACIÓN ACÉTICA PARA CADA TRATAMIENTO .....	57
4.10. FERMENTACIÓN ÁCIDO ACÉTICO DADA AL VINO DE MUCÍLAGO DE CACAO CCN-51 .....	58
4.10.1. ANÁLISIS DE CURVAS DE FERMENTACIÓN .....	59
4.10.2. ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LAS GRADIENTES DE FERMENTACIÓN .....	61
4.11. ANÁLISIS FISCOQUÍMICO DEL VINAGRE DE CACAO CCN-51.	64
4.12. ANÁLISIS SENSORIAL DEL VIANGRE DEL VINO DEL CACAO ..	65
4.12.1. APARIENCIA .....	66
4.12.2. COLOR .....	66
4.12.3. AROMA.....	67
4.12.4. SABOR .....	67
4.12.5. ACIDEZ.....	67
4.12.6. ACEPTABILIDAD GENERAL.....	67
<b>5. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....</b>	<b>68</b>

5.1. CONCLUSIONES.....	68
5.2. RECOMENDACIONES .....	69
<b>BIBLIOGRAFIA.....</b>	<b>71</b>
<b>ANEXOS .....</b>	<b>75</b>

# ÍNDICE DE TABLAS

	PÁGINA
<b>Tabla1.</b> Características diferenciales de los géneros <i>Gluconobacter</i> , <i>Acetobacter</i> y <i>Pseudomonas</i> . ....	25
<b>Tabla 2.</b> Condiciones Geográficas del cantón Montalvo.....	27
<b>Tabla 3.</b> Análisis proximal del exudado del mucílago de cacao.....	31
<b>Tabla4.</b> Parámetros de adecuación para el mosto en la fermentación alcohólica. ....	32
<b>Tabla 5.</b> Análisis proximal del vino del mucílago de cacao.....	37
<b>Tabla 6.</b> Condiciones de agitación y oxigenación para cada tratamiento. ....	38
<b>Tabla 7 .</b> Análisis Físico-Químico del Sustrato. ....	47
<b>Tabla 8.</b> Pesos promedio del fruto de cacao y sus partes constitutivas. ....	50
<b>Tabla 9.</b> Resultados del análisis Físico-Químico y Proximal del Exudado del Mucílago de Cacao. ....	51
<b>Tabla 10.</b> Parámetros iniciales del proceso de fermentación alcohólica. ....	52
<b>Tabla 11 .</b> Resultado del Análisis Físico-Químico del Vino de Cacao .....	54
<b>Tabla 12.</b> Acidez total medida en la madre del vinagre. ....	55
<b>Tabla 13.</b> pH de los sustratos. ....	56
<b>Tabla 14 .</b> Acidez total medida de cada muestra a fermentar. ....	57
<b>Tabla 15.</b> Gradiente de ácido acético producidos/día según tratamiento. ....	62
<b>Tabla 16.</b> Gradiente de ° GL consumidos/día según tratamiento. ....	64

**Tabla 17.** Resultado del Análisis Físicoquímico del Vinagre del Vino de Cacao para los 3 Tratamientos. ....64

**Tabla 18.** Análisis Sensorial por Atributos del Vinagre de Cacao.....65



## ÍNDICE DE FIGURAS

	PÁGINA
<b>Figura1.</b> Vista microscópica de <i>acetobacter aceti</i> .....	23
<b>Figura2.</b> Proceso de extracción del exudado del mucílago del cacao (Luzuriaga 2012).....	29
<b>Figura3.</b> Esquema del micro fermentador utilizado para la fermentación alcohólica del exudado del mucílago del cacao. ....	33
<b>Figura 4.</b> Procedimiento realizado en la elaboración del vino de cacao.....	34
<b>Figura 5.</b> Vino final (sustrato) del mucílago del cacao.....	36
<b>Figura6.</b> Procedimientos realizados en la elaboración de vinagre del mucilago del cacao. ....	39
<b>Figura 7.</b> Esquema del acetificador experimental diseñado para el proceso de fermentación acética del vino del exudado del mucílago del cacao. ....	42
<b>Figura 8.</b> Diseño experimental .....	46
<b>Figura 9.</b> Cinética de fermentación alcohólica del exudado del mucilago de cacao CCN-51 para las 6 repeticiones.....	53
<b>Figura 10.</b> Fermentación acética del vino del mucílago del cacao en proceso. ....	58
<b>Figura 11.</b> Cinética de fermentación (ácido acético) para cada uno de los tratamientos. ....	60
<b>Figura 12.</b> Cinética de fermentación (sustrato consumido) para cada uno de los tratamientos.....	60
<b>Figura 13.</b> Gradiente de ácido acético producido/día según tratamientos ..	62

**PÁGINA**

<b>Figura 14.</b> Gradiente de ° GL consumidos/día según tratamientos.....	63
<b>Figura 15.</b> Análisis Sensorial por promedios de los Atributos del Vinagre del Vino del Cacao.....	66

## ÍNDICE DE ANEXOS

	<b>PÁGINA</b>
<b>ANEXO 1.</b> Fotografías del proceso de elaboración de vinagre del exudado del mucílago de cacao.....	75
<b>ANEXO 2.</b> Tabla de Contingencia de Datos Obtenidos en la Elaboración de Vinagre del Vino del Mucílago de Cacao .....	79
<b>ANEXO 3.</b> Datos Promedio de la Gradiente de Acidez Producida y °GL Probables Consumidos. ....	81
<b>ANEXO 4.</b> Análisis de Varianza para Gradiente °GL Consumidos/Día según tratamiento .....	83
<b>ANEXO 5.</b> Análisis de Varianza para Gradiente Acidez Producida/Día.....	84
<b>ANEXO 6.</b> Ficha de Análisis Sensorial .....	85
<b>ANEXO 7.</b> Calificación sensorial del vinagre por atributos. ....	88
<b>ANEXO 8.</b> Análisis de Varianza para “Apariencia” del Vinagre de Cacao ...	94
<b>ANEXO 9.</b> Análisis de Varianza para “Color” del Vinagre de Cacao .....	95
<b>ANEXO 10.</b> Análisis de Varianza para “Olor” del Vinagre de Cacao .....	96
<b>ANEXO 11.</b> Análisis de Varianza para “Sabor” del Vinagre de Cacao .....	97
<b>ANEXO 12.</b> Análisis de Varianza para “Acidez” del Vinagre de Cacao .....	98
<b>ANEXO 13.</b> Análisis de Varianza para “Aceptabilidad Global” del Vinagre de Cacao.....	99
<b>ANEXO 14.</b> Análisis Físicoquímico del Sustrato.....	100
<b>ANEXO 15.</b> Análisis Físicoquímico del Vinagre “C” (Tratamiento 1).....	101

**PÁGINA**

**ANEXO 16.** Análisis Fisicoquímico del Vinagre “B” (Tratamiento 2)..... 102

**ANEXO 17.** Análisis Fisicoquímico del Vinagre “A” (Tratamiento 3)..... 103

## RESUMEN

El presente trabajo se basa en la investigación sobre la factibilidad de obtener un producto fermentado como es el vinagre, resultado de un proceso piloto controlado, el cual consistió inicialmente en diseñar y elaborar un acetificador piloto a pequeña escala basado en el acetificador Frings para posteriormente, y a través de una fermentación sumergida partiendo del vino del mucílago del cacao CCN-51 como sustrato, obtener vinagre de acuerdo con la norma INEN 2296 “vinagre requisitos”. El vinagre se obtuvo mediante dos procesos microbianos separados: primero una fermentación alcohólica de los azúcares naturales presentes en el mucilago de cacao en un rango del 10-13%, adicionando sacarosa para rectificar el contenido de sólidos solubles para la acción y conversión de las levaduras del género *saccharomyces cerevisiae*; y en segundo lugar la llamada fermentación oxidativa del alcohol obtenido, para esto se realizó la caracterización química del sustrato, estableciendo las condiciones óptimas para una fermentación acética, utilizando como inóculo el cultivo “madre del vinagre” en el cual se desarrollaron las bacterias del género *acetobacter* responsables de la fermentación. Para la investigación se utilizó un diseño simple del efecto de un solo factor como la exposición al O<sub>2</sub> en 3 niveles/tratamientos (T1=24, T2=18, T3=12 horas/día) de tiempos de aireación diferentes, cada nivel con dos repeticiones utilizando como unidad de volumen de oxigenación constante 0.5 vvm (volumen de aire por unidad de volumen de medio por minuto) de acuerdo al tiempo de cada tratamiento, analizando el efecto sobre las características fisicoquímicas y sensoriales del vinagre final. Cada repetición fue realizada en condiciones similares, 400 rpm (revoluciones por minuto) de agitación, un rango de 20-32 °C de temperatura y un sistema de enfriamiento semiautomático. Los datos de las respuestas experimentales fueron analizados estadísticamente mediante el Programa Statgraphics Centurión 2008 determinándose que el T1 (24 horas de exposición al O<sub>2</sub>) fue el óptimo obtenido, habiendo alcanzando la mayor producción de ácido

acético 3.50 g/L y un consumo final de 3.5 ° GL, estos resultados son producto de una mayor concentración de oxígeno disuelto en la fermentación, cumpliendo además con las especificaciones de la norma INEN 2296. El mismo tratamiento (T1) obtuvo un mayor puntaje (3.94/5) en cuanto a la aceptabilidad global y al analizar estadísticamente los datos obtenidos mediante un diseño de bloques multifactorial, se encontraron diferencias significativas con respecto a los otros (T2 y T3), que fueron sometidos a una evaluación sensorial por atributos. Se concluyó que la fermentación acética dada al vino del mucílago del cacao CCN-51 con un tiempo de exposición al O<sub>2</sub> continua a 0.5 vvm, 400 rpm de agitación y un control adecuado de temperatura, produce un vinagre de condiciones sensoriales aceptables.

## ABSTRACT

This study development is based on the investigation about the feasibility to obtain a fermented product such as vinegar under a controlled pilot trial, which initially consist in design and developing a small scale design based on the Frings acidifier, through a submerged fermentation and starting from the cocoa mucilage CCN-51, as a substrate, obtain vinegar according to the INEN 2296 norm requirements "vinegar requirements". Vinegar is obtained by two isolated microbial procedures, first a sugar alcoholic fermentation from the natural sugars present in the mucilage of cocoa in the range of 10-13%, adding sucrose to rectify the soluble solids content for the action and conversion by yeast gender *saccharomyces cerevisae* and second, the oxidative fermentation from the obtained alcohol, a chemical characterization of substrate was made, establishing optimum conditions for an acetic fermentation using as an inoculum the crop "vinegar mother" in which bacteria from de *acetobacter* genus, responsible for fermentation are grown. A one factor simple design was experienced for the investigation as the O<sub>2</sub> in 3 levels/treatments (T1=24, T2=18, T3=12 hours/day) from different aeration periods of time each level with two repetitions using as constant unit 0.5 vvm (air volume by half volume unit per minute) according to each treatment time, analyzing the effect on the final vinegar physicochemical and sensorial characteristics. Each repetition was carried in similar conditions, 400 rpm (revolutions per minute) agitation, a 20-32 °C temperature range and a semi-automatic cooling system. The experimental answers data were statically analyzed by the Statgraphics Centurion 2008 program determining that the T1 (24 hours of exposition to O<sub>2</sub>) treatment was the best obtained reaching the highest acetic acid production 3.50 g/L and a final 3.5 °GL consumption due to a higher oxygen concentration dissolved in fermentation, meeting the INEN No. 2296 NORM specifications. The same treatment (T1) get also the higher score (3.94/5) according to the global acceptability after a statistically

analyzing data by a multifactorial block design in which significant differences were found from this to the other treatments (T2, T3), submitted to a sensorial evaluation by attributes. It was concluded that the acetic fermentation given to the wine of mucilage cocoa CCN-51 with a continuous exposure to O<sub>2</sub> at 0.5 vvm, 400 rpm agitation and adequate temperature control, produces acceptable sensory conditions vinegar.



# 1. INTRODUCCIÓN

Conociendo la viabilidad de obtener vinagre a partir de un sustrato alcohólico por medio de la oxidación del etanol por acción de las bacterias acéticas, se planteó la investigación respecto a la posibilidad de obtener vinagre con base en el vino del exudado del mucílago del cacao desarrollado en la tesis “Extracción y aprovechamiento del Mucílago de Cacao (*Theobroma cacao* L.) como materia prima en la elaboración de vino” por la tesista Luzuriaga, D. (2012), ambas investigaciones como parte del proyecto “OPTIMIZACIÓN DE DESECHOS DE LA AGROINDUSTRIA DEL CACAO CCN-51 EN LA ELABORACIÓN DE VINO, VINAGRE Y SEMILLAS PRODUCTIVAS PARA SU CULTIVO” de la Universidad Tecnológica Equinoccial.

Por medio de esta investigación se buscó elaborar vinagre a partir de la captación de los residuos resultantes de la fermentación espontánea del cacao, específicamente el exudado del mucílago que se genera en gran cantidad durante el proceso de extracción de la almendra fresca. Aunque el mucílago es necesario para la fermentación, a menudo hay más de lo necesario, es por esta razón que se buscó aprovechar este líquido reduciendo el impacto ambiental y contribuyendo a la productividad de la industria cacaotera como un valor agregado de la misma (Kalvatchev, Garzaro & Guerra, 1998). Al momento se sabe que económicamente se aprovecha sólo la almendra que representa un 10% de la masa del fruto fresco, esto ha derivado en serios problemas ambientales debido a que las pulpas y cáscaras se desechan en los terrenos aledaños a los cacaoteros, lo que deriva a su vez en la contaminación de suelos y cuerpos de agua cercanos en época de lluvias así como olores fétidos y deterioro del paisaje (Franco, et al, 2010).

En Ecuador la producción del cacao necesita modernizarse dada la importancia ancestral y económica de su cultivo, según el diagnóstico de UNCTAD/Programa de Facilitación del Biocomercio (2005) para el desarrollo del comercio agrícola por parte de la ONU. La participación en el mercado

del “cacao sabor arriba” producido en Ecuador representa el 4% del consumo mundial, con una tasa de crecimiento entre el 5 y 10% por año, es por esta razón que considero se debe buscar el aprovechamiento íntegro del cultivo tanto del cacao nacional “sabor arriba” como del híbrido desarrollado por el INIAP variedad CCN-51 entre otros, en consideración a lo anteriormente expuesto se buscó dar una funcionalidad al exudado del mucílago, que a su vez contribuirá (una vez implementado) a lograr certificaciones tanto orgánicas como eco sustentables.

La variedad de cacao ecuatoriano CCN-51 es una de las fortalezas agrónomas del país, se ha probado que con la utilización de prácticas adecuadas puede ser un cultivo resistente a plagas y enfermedades alcanzando altos niveles de productividad (Rojas, 2007). Con base en este planteamiento en esta investigación se buscó valorizar el líquido del exudado del mucílago del cacao a través de su fermentación ácido acética a fin de obtener vinagre como producto final, generando así un valor agregado que contribuya al crecimiento del sector cacaotero, constituyendo un ingreso extra para el agricultor/productor y contribuyendo a su vez a un mejoramiento productivo y ambiental.

Para tal propósito, se han planteado los siguientes objetivos:

### **1.1. OBJETIVO GENERAL**

Obtener vinagre a partir del aprovechamiento del exudado del mucílago de la almendra fresca del cacao CCN51.

### **1.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Realizar una fermentación alcohólica al mucílago del cacao que servirá como sustrato para la producción de vinagre.
- Describir e investigar el proceso de obtención de vinagre.
- Analizar y observar las variables críticas del proceso de fermentación ácido acético.
- Caracterizar el producto final obtenido.
- Evaluar la aceptación sensorial.

## 2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

### 2.1. EL CACAO

El cacao o cacaotero, es un árbol tropical de la familia de las *esterculiáceas* a la que pertenecen otros árboles como el árbol botella (*Brachychiton populneus*) o el árbol de la cola (*Cola nítida*, *Cola acuminata*). Existen aproximadamente unas 20 especies del género *Theobroma*, que es el fruto de estos árboles entre ellas la más importante por su valor comercial es el cacao (*Theobroma cacao L.*), porque a partir de sus semillas se obtienen productos tan apreciados como el polvo de cacao o la manteca de cacao, que sirven para la elaboración del chocolate (Enríquez, 1989).

El árbol de cacao, crece silvestre en los bosques de América Central en la zona situada entre los 26 ° latitud norte y los 26 ° latitud sur del Ecuador, se encuentra también como árbol cultivado en las zonas tropicales del oeste del África y Asia. En este estado silvestre, el cacaotero alcanza una altura máxima de 9 metros, aunque los árboles cultivados son más pequeños para facilitar su recolección, estos no suelen sobrepasar los 2 o 3 metros de altura ya que facilitan su cultivo. Posee troncos erectos y lisos de color marrón pálido casi blanco, hojas ovales con ápice bien marcado de hasta 25 cm de longitud de un color rojizo joven y verde brillante cuando son adultas. Las flores son pequeñas con pétalos de color amarillo cremoso y sépalos rosados. Crecen sobre los troncos o las ramas más gruesas, a partir de estas se producen los frutos, unas bayas alargadas y con costillas de hasta 30 cm de largo que se vuelven de un marrón rojizo brillante, marronáceo, oscuro o negro café cuando maduran. En su interior, envueltas en una pulpa lechosa, se encuentran 20-40 semillas a partir de las cuales se elaboran todos los productos derivados del cacao (Enríquez, 1989).

### **2.1.1. VARIEDADES**

Se denomina a los diferentes tipos de cacao de acuerdo a las zonas donde fue cultivado y sus características organolépticas, así como su calidad, productividad y variedad, entre estos tenemos; Criollo, Forastero, Trinitario, Nacional de Ecuador y CCN-51, este último es un híbrido desarrollado por el INIAP y es en el que se basa esta investigación (Enríquez, 1989).

### **2.1.2. CRIOLLO**

Es la variedad primitiva, esta crecía en América central cuando llegaron los colonizadores. Se considera una variedad de cacao “fino de aroma” por lo que es muy apreciada para la elaboración de los productos a base de cacao, el fruto tiene la corteza muy suave, las semillas redondeadas color blanco o violeta, poseen un contenido menor de taninos. Se cultiva principalmente en América central, México, Caribe, Indonesia, Nueva Guinea, Java, Sri Lanka, Ecuador, Colombia y Brasil. De momento solo ocupa un 10% de la producción mundial, aunque su cultivo se va extendiendo y se intenta introducir en los países africanos (Memorias del primer congreso Venezolano del cacao y su industria, 2000).

### **2.1.3. FORASTERO**

El cacao Forastero, llamado amazónico por encontrarse distribuido por la cuenca del Río Amazonas y sus afluentes, posee mazorcas amarillas, con un pequeño cuello de botella en la base, las almendras son aplanadas y

pequeñas, de color morado. Constituye el 80% de la producción mundial. En este grupo se incluye el cacao Nacional de Ecuador. Se cultiva también en Brasil, África Occidental y Este de Asia (Memorias del primer congreso Venezolano del cacao y su industria, 2000).

#### **2.1.4. TRINITARIO**

El cacao tipo Trinitario, es diferente y heterogéneo. Probablemente es el resultado de cruce entre el cacao de tipo Criollo y el Forastero, puesto que su calidad es intermedia, pero con un rendimiento superior a éstas (Villavicencio, 2001).

Fue seleccionado en Trinidad, de donde tomó su nombre. Posee mazorcas con más de 30 semillas y almendras de color variable. Ocupan del 10 al 15% de la producción mundial (Memorias del primer congreso Venezolano del cacao y su industria, 2000).

#### **2.1.5. NACIONAL DEL ECUADOR**

El chocolate y sus componentes básicos provienen de dos variedades de cacao en general: Criollo y Forastero. El 96% del cacao tradicional ecuatoriano es un complejo “nacional x trinitario”, se lo clasifica dentro de los forasteros pero es de tipo fino de aroma (Biotrade, 2010).

Es un producto tradicional de Ecuador que toma su nombre desde hace dos siglos, cuando el cacao era cultivado en las zonas de la cuenca alta de los ríos Daule y Babahoyo, los cuales forman el Río Guayas en las riveras del cual se encuentra la ciudad de Guayaquil, que es desde donde se realizan

hasta la actualidad todas las exportaciones de cacao hacia el mundo. En esas épocas ya se volvió famoso el cacao entre los extranjeros que compraban el cacao ecuatoriano y para dar una explicación del origen del mismo se empezó a utilizar el término “cacao arriba”. El cacao nacional o arriba es particularmente susceptible a los cambios climáticos y es difícil de conseguir genéticamente, su producción varía entre 180 - 260 kg/ha/año con una maduración más larga y lenta que el común, además las semillas poseen calidad y aroma particularmente fino y suave, por lo tanto son utilizados solamente en la producción del chocolate de alta calidad. El cacao de Ecuador significa alta calidad y sabores especiales. Los mercados de calidad tienen un interés creciente en encontrar cacao de alta calidad, de sabores y orígenes especiales (Biotrade, 2010).

#### **2.1.6. CCN-51**

Es una variedad del cacao ecuatoriano, cuyo creador 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 (El Universo, 2005).

Tiene un mayor potencial de rendimiento ya que empieza a dar fruto al final del segundo año, en un rango de 3-4 quintales por Ha por año (Peña, 2003).

El CCN-51 ha probado ser un cultivo más resistente a plagas y enfermedades que el cacao fino o de aroma, alcanzando niveles estables de productividad de 50-55 quintales por Ha por año a partir del sexto año, casi siete veces más que los niveles de productividad actuales de los productores ecuatorianos (Biotrade, 2010).

Estas características hacen del clon CCN-51 una aceptable alternativa de producción. Con un adecuado proceso de fermentación este tipo de cacao puede lograr buenas características de calidad.

### 2.1.7. CACAO EN EL MUNDO

El cacao es una planta originaria del “Nuevo Mundo”, de las tierras bajas de centro y sur América, de los valles de los ríos Amazonas y Orinoco, de zonas húmedas, cálidas y sombreadas. Pertenece a la familia botánica *Sterculiaceae* que tiene varios géneros, entre ellos el *Theobroma* sp que a su vez tiene alrededor de veinte especies dentro de las cuales está el cacao, su nombre científico es *Theobroma cacao* (Gepts, 2002).

La primera parte de este nombre viene del idioma griego y es una palabra compuesta de dos partes, *teo* que significa dios y *broma* que significa alimento, por lo que significaría “alimento de los dioses”. La segunda parte, cacao viene del maya *ka'kaw* relacionada con el fuego que se creía que habitaba en sus semillas (Fariñez,2007), ricas en almidón, proteínas, materias grasas, vitaminas, antioxidantes; y cargadas con teobromina, una sustancia natural que se encuentra en las semillas, las cuales contienen de 1% a un 4% de está de efecto estimulante similar a la cafeína (Peña, 2003).

La especie *Theobroma cacao* se subdivide geográficamente en dos subespecies: *Theobroma cacao cacao* que da origen a la variedad Criollo nativo de México, Guatemala, Belice; y *Theobroma cacao sphaerocarpum* que da origen a la variedad *Calabacillo* nativo del bosque lluvioso sudamericano de la Amazonía, valle del Orinoco y Guyanas (Gepts, 2002).

La palabra cacao tuvo su origen en las palabras mayas “*Kaj*” que significa amargo y “*Kab*” cuyo significado es jugo. La fusión de estas dos palabras dio como resultado “*KajKab*” para finalmente transformarse en cacao. La palabra



chocolate parece también tener su origen en la lengua hablada por los mayas; inicialmente fue “*chacau*” que significaba alguna cosa caliente, para finalmente y pasando por varios modismos terminar como chocolate (Enríquez, 1989).

### **2.1.8. CACAO EN EL ECUADOR**

Las primeras noticias que se tiene en el país sobre la producción de cacao datan de 1780, lo que indica que el Ecuador tiene más de 200 años produciendo cacao. Desde 1900 la producción de cacao ha sido siempre ascendente, así es como el país llegó a ser uno de los principales exportadores de cacao representando el 20% del total de la producción mundial. Pero en 1980 y debido a la competencia internacional, el cierre de mercados y ataque de enfermedades a las plantaciones esta producción decayó (Enríquez, 1989).

En lo referente a los usos nativos del cacao en el Ecuador, se tiene que en las tierras bajas del país, se utilizaban tradicionalmente el arilo crudo y las semillas fritas y tostadas del cacao como comestibles. Los pueblos Chachi, Cofán, Secoya, Siona, Kichwa del Oriente, Wao, Shuar, lo usan para elaborar bolas o tortillas de cacao. Esta planta es un importante cultivo alimenticio para los Tsa'chi de Pichincha. Se usa también para preparar bebidas estimulantes y el fruto inmaduro trata tumores de la piel y úlceras. La resina de la cáscara y el fruto inmaduro se aplica como cicatrizante de cortaduras. También se usan para tratar afecciones posparto, la anemia, la fiebre y para detener hemorragias. La planta forma parte de sistemas agroforestales, sirviendo también de alimento de monos “machines” (*Cebus albifrons*) y “maquisapas (*Ateles belzebuth*), (De la torre, et al., 2008).

Además de estos usos autóctonos, el cacao una de las plantas nativas históricamente exportadas por nuestro país al mundo, y es además “la planta con mayor valor agregado” del Ecuador, pues es utilizada para la producción de chocolates finos y de aroma y otros elaborados, muy cotizados internacionalmente (De la Torre, L. et al., 2008).

En el siglo XIX operó una feroz expansión de la producción y de la extensión de territorio ecuatoriano dedicados al cacao. El negocio de cacao estaba en auge y sus precios al alza, tanto que en 1894, Ecuador fue el primer productor de cacao del mundo con el 28% de la producción mundial, los grandes monopolios chocolateros que geográficamente se encontraban en Europa y Estados Unidos, se vieron motivados a conseguir un cacao más barato, en el caso europeo, forzaron a cultivar cacao a sus colonias africanas, los actuales comprendían Ghana, Costa de Marfil, Nigeria; con lo cual la producción mundial creció fuertemente, y mucho más rápido que la demanda, esta producción ocasionó la caída de los precios mundiales e hizo que la prosperidad se desmoronara a partir de 1914 y se iniciara la crisis del cacao y por ende la crisis del país (Chiriboga & Piccioni 1982).

## **2.2. MUCÍLAGO**

Se denomina “*almendra mucilaginosa*” a la almendra fresca obtenida al abrir el fruto o mazorca de cacao, por lo cual, mucílago se refiere a la membrana de color blanco que recubre a la almendra o pepa de cacao, previo a su fermentación en cajas. Este mucílago es desechado sin darle un uso productivo en la actualidad por la mayoría de los agricultores y asociaciones cacaoteras del país.

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 (8-10%). Durante el proceso de cosecha de las semillas de cacao (producto de exportación), la pulpa es removida por fermentación e hidrolizada por microorganismos. Aunque la pulpa es necesaria para la fermentación, a menudo la cantidad misma excede a la necesaria para el proceso espontáneo. El exceso de pulpa, posee un característico y apetecido sabor propio y ha sido utilizado para hacer productos como: jalea de cacao, alcohol y vinagre, nata y pulpa procesada. La pulpa puede ser consumida fresca en forma de jugos o "batidos". Además, la pulpa se puede preservar por congelación y ser utilizada como saborizante de helados y yogures. Aproximadamente 40 litros de pulpa se pueden obtener de 800 kilos de semillas frescas (Kalvatchev, Garzaro & Guerra, 1998).

## **2.3. VINAGRE**

### **2.3.1. ANTECEDENTES HISTÓRICOS**

La palabra vinagre procede etimológicamente del latín *vinum acre*, de la que deriva la locución francesa *vin aigre* equivalente a vino agrio, pero esta aceptación de su procedencia no queda relegada al vino, sino a cualquier sustrato amiláceo es susceptible de ser utilizado. El vinagre ha formado parte de la alimentación humana desde la antigüedad más remota como condimento y conservador de alimentos, así como base de remedios curativos sencillos para hombres y animales. La fermentación alcohólica seguida de la acética se produce espontáneamente sobre cualquier sustrato azucarado expuesto al polvo y a los insectos que transportan levaduras y bacterias (Raymond & Donald, 1966).

### **2.3.2. DEFINICIÓN**

El vinagre según Raymind & Donald (1966), es un producto químico que se usa como condimento y se prepara por dos procesos microbianos separados, primero una fermentación alcohólica de diversas materias primas que contienen azúcares naturales o fermentables por conversión, por especies de levaduras del género *Saccharomyces*, y en segundo lugar la llamada fermentación oxidativa del alcohol obtenido por especies de bacterias del género *Acetobacter*. Además de ácido acético, los vinagres contienen cantidades variables de los siguientes productos: ácidos orgánicos no volátiles (principalmente ácidos málico y cítrico con pequeñas cantidades de ácidos succínico y láctico; en el vinagre destilado puede haber ácido fórmico); glicerol; azúcares sin fermentar y no fermentables; alcohol sin oxidar y acetaldehído; acetoína (acetilmetilcarbinol); fosfatos, cloruros y sulfatos de potasio, calcio y otros cationes.

Actualmente, el vinagre se define, según el Codex Alimentarius (2000), como un “líquido apto para el consumo humano, producido exclusivamente con productos idóneos que contengan almidón o azúcares por el procedimiento de doble fermentación, alcohólica y acética, y que contiene una cantidad específica de ácido acético”.

### **2.3.3. MADRE DEL VINAGRE**

Según Hernández (2003), las bacterias acéticas, que son los microorganismos responsables de la transformación del etanol en ácido acético, se encuentran en la superficie de un vino en reposo formando una película de celulosa llamada “madre del vinagre”, la película o velo aparece por el efecto llamado “picado espontaneo” del vino, este fenómeno fue por

primera vez utilizado en el método Orleans el cual se explica a detalle en el numeral 2.5.2 de este trabajo, la presencia de bacterias acéticas en la superficie se debe a que al ser aerobios estrictos es la única forma que tienen estos microorganismos de obtener oxígeno y poder oxidar el etanol a ácido acético.

#### 2.3.4. TIPOS DE VINAGRE

Se resumen a los siguientes tipos:

- **Vinagre de Mesa:** Contiene un 5 por 100 de acidez y se obtiene de la papa y de cereales fermentados.
- **Balsámico (aceto balsámico):** Es una especialidad italiana originaria de la región de Emilia Romagna obtenida por la fermentación de zumo de uva cocida concentrada, después de un largo envejecimiento en barricas de madera (a partir de 5 años comienzan a dar los primeros resultados), pierde parte del agua, la acidez disminuye y se realzan los distintos sabores, siendo el sabor y el precio superiores a los de cualquier vinagre (los botes auténticos deben estar etiquetados y precintados con el sello original), es color oscuro y tiene sabor dulce.
- **Vinagre de vino:** Se obtiene exclusivamente por la fermentación acética del vino. Tiene una acidez del 6% y es muy rico en sustancias.
- **Vinagre de sidra:** Es el que se obtiene por la fermentación acética de la sidra. Tiene un sabor más suave que el de vino, más claro y un porcentaje de acidez inferior al 5%
- **Vinagre de hierbas:** Vinagre con un porcentaje del 5% de acidez y aromatizado con finas hierbas.

- **Vinagre de Jerez:** Se obtiene de vinos de Jerez envejecidos y su porcentaje de acidez supera el 5%. Son considerados de alto valor comercial y gastronómico.
- **Vinagre de frutas:** Se obtiene de la fermentación acética de cualquier vino de frutas o directamente del zumo de las frutas, llegando a la producción de ácido acético por cualquier método, exceptuando de manzana y uva (Herman, Reinhold & Gil, 2002).

## 2.4. FERMENTACIÓN ALCOHOLICA

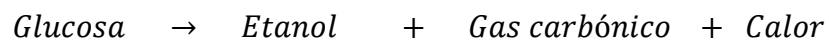
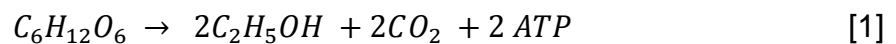
Según Cinta, Álvarez & Zaragoza (1998), es común a todos los procesos de fermentación el de significar una renuncia, concretamente a desarrollar toda la energía capaz de obtenerse mediante un proceso de oxidación total. Las levaduras prefieren obtener menos energía, pero bajo una forma aprovechable. Así, por ejemplo, en las fermentaciones de los carbohidratos éstos no se desdoblán hasta reducirse a  $\text{CO}_2$  y  $\text{H}_2\text{O}$ , sino que se obtienen productos finales relativamente ricos aún en energía, es por esto que la obtención de etanol, servirá como sustrato para la fermentación acética.

### 2.4.1. DEFINICIÓN

Es un conjunto de transformaciones bioquímicas, en ausencia de aire ( $\text{O}_2$ ), originado por la actividad de microorganismos (levaduras) que convierten los hidratos de carbono (azúcares como: glucosa, fructosa, sacarosa, almidón, etc.) en productos finales como alcohol etílico ( $\text{CH}_3\text{-CH}_2\text{-OH}$ ), dióxido de carbono en forma de gas ( $\text{CO}_2$ ) y moléculas de ATP, las cuales son

consumidas por los propios microorganismos en su metabolismo celular anaerobio, como energía necesaria para sobrevivir (García, 2008).

En el caso concreto de la fermentación alcohólica, al descomponerse la glucosa en alcohol etílico y dióxido de carbono, se desprende sólo un 7.33% de la energía susceptible de recuperación. Desde el punto de vista energético este rendimiento es muy bajo, pero lo compensa el hecho de que estas cortas cantidades de energía representan un verdadero capital productivo. Gracias a las levaduras presentes en el mosto, los azúcares son transformados mediante un cierto número de etapas en etanol y anhídrido carbónico, según la ecuación de Gay-Lussac (Hernández, 2003):

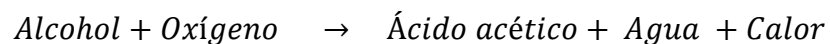
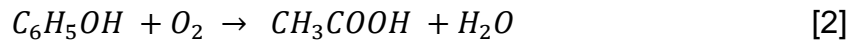


Como se observa en la fermentación alcohólica no se quema nada, ni aparece por ninguna parte el oxígeno de procedencia exterior, que no coopera directamente en las reacciones. Hoy consideramos las fermentaciones como procesos anaerobios, en contraste con los aerobios, donde el oxígeno atmosférico no sólo no interviene, sino que es indispensable para su desarrollo (Hernández, 2003).

## 2.5. FERMENTACIÓN ÁCIDO ACÉTICA

La fermentación ácido acética teniendo como sustrato etanol en un intervalo de 8-12%, es sintetizado a través de bacterias del género *acetobacter*, esto

consiste en la oxidación del sustrato, produciendo ácido acético y agua, llevándose a cabo en presencia de oxígeno, la reacción que ocurre se muestra en la ecuación 2:



Según Llaguno & Polo (1991), las ventajas de la obtención de vinagre en acetificadores sin relleno, en cultivo sumergido, son muchas comparadas con los métodos tradicionales de producción (Orelans, Luxemburgo). Son más altos los rendimientos de la transformación del alcohol en acético (hasta el 94%), mayor velocidad a que se desarrolla el proceso (25-30 horas) así como la uniformidad del producto y sobre todo, se puede lograr la acetificación de iguales volúmenes de alcohol en mucho menor volumen de instalación, con el consiguiente ahorro de espacio, pudiendo trabajar con dispositivos automáticos que no sólo regulen el control de la temperatura y de la aireación, sino también los ciclos de carga y descarga.

A continuación se describen 3 métodos posibles para desarrollar la fermentación acética del etanol.

### **2.5.1. FERMENTACIÓN SUMERGIDA**

El autor Hromatka (1953) citado en Raymond & Donald (1966), se define como un proceso en el que el sustrato y el inóculo se llevan a un medio estéril en el cual se mezclan constantemente: en paralelo un suministro de



aire estéril se burbujea a través del medio (fermentación aerobia), a través de este se describe un proceso para la conversión de alcohol en ácido acético por este método utilizando aeración continua.

Bajo este, las bacterias del género *acetobacter* se encuentran suspendidas en un medio alcohólico contenido en un tanque de acero inoxidable provisto de aireador y refrigerador. Se inyecta de manera continua burbujas muy pequeñas de O<sub>2</sub> a través de todo el medio alcohólico, en este proceso son perjudiciales el oxígeno puro y en mezcla de 60% oxígeno y 40% nitrógeno. Se obtienen rendimientos teóricos elevados de ácido acético y la conversión se controla de mejor forma.

### **2.5.2. MÉTODO ORLEANS**

Durante el transporte de los vinos de Orleans a París, descubrieron accidentalmente que ciertas barricas llegaban picadas; es decir, que los vinos que guardaban en estas barricas se avinagraban, tal fue la importancia y la cantidad de vino agrio, que se constituyó una bodega de vinagreros en 1394. Este método es muy simple, el equipo que se utiliza es sencillo, económico y puede ser operado en pequeña escala, sin embargo es muy lento y el rendimiento del producto obtenido no supera el 85% respecto al valor teórico. En la actualidad se produce muy poco vinagre por este sistema, la fermentación acética de acuerdo a este método se lleva a cabo en un barril de madera, con una capacidad que se encuentra en el rango 45-200 L., el barril se coloca en forma horizontal para aumentar la superficie de contacto entre el líquido y el aire, en la parte inferior cuenta con la llave de extracción del vinagre producido (Hernández, 2003).

En una de las paredes, a una altura por encima de la superficie del líquido, posee dos huecos: uno es una ventana de observación, el otro cubierto con cedazo fino para impedir la entrada de insectos permite la aireación y el

ingreso de los microorganismos. En la parte superior del barril se introduce un embudo con una espiga suficientemente larga para que llegue al fondo, su función es suministrar jugo alcohólico fresco al recipiente. Para iniciar la fermentación, se adiciona al barril que contiene el volumen del jugo alcohólico, un volumen de vinagre sin pasteurizar, así las bacterias comienzan a multiplicarse y, al cabo de aproximadamente siete días, forman una capa sobre la superficie del líquido (Hernández, 2003).

En este momento el ácido acético empieza a producirse, periódicamente se mide la acidez y se agrega jugo alcohólico en determinadas cantidades, de manera que la acidez no disminuya del 2%. A partir de la estequiometría de la reacción, se sabe que por cada mililitro de alcohol presente en el jugo alcohólico se formara un gramo de ácido acético; por lo tanto, la suma de la concentración de alcohol (v/v) y de ácido acético (p/v) permanece constante durante toda la fermentación. Esta suma se conoce como GK (Gesamnte Konzentration) (Hernández, 2003).

$$GK = \% \text{ alcohol } \left( \frac{v}{v} \right) + \% \text{ ácido acético } \left( \frac{p}{v} \right) \quad [3]$$

Si se sabe el GK del jugo inicial, se podrá conocer la acidez final del vinagre, con solo determinar la concentración de etanol. Por lo tanto, los parámetros para decidir cuándo sacar la mitad de contenido del barril son la concentración del alcohol y de ácido. Después de que la fermentación finaliza, el vinagre se almacena, por lo menos durante un mes, en recipientes sellados para permitir que sedimenten los coloides inestables presentes; luego, se embotella. Para evitar el crecimiento de bacterias sobreoxidativas en el vinagre embotellado, se aplica una de las siguientes tres opciones: pasteurización (70°C por quince minutos), adición de sulfito de sodio (70 ppm) o adición de una pequeña cantidad de sal (1 a 2% p/v) (Hernández, 2003).

### 2.5.3. MÉTODO LUXEMBURGUES

El fundamento de este método y su diferencia fundamental con el método de Orleans está en emplear virutas de haya que periódicamente quedan sumergidas en el líquido que esta acetificándose. Así se consigue aumentar la superficie de acetificación de la bacteria y mejorar la transferencia de oxígeno, por lo que aumenta la velocidad de acetificación. El tonel de este método está dividido en dos partes desiguales por un falso fondo, agujereado, con numerosos y finos orificios. La parte menor del tonel está llena de virutas de haya, en la parte superior se encuentra un orificio por el cual penetra un largo termómetro para controlar la temperatura, aspecto muy interesante para todo método rápido o semirrápido, el vinagre elaborado, se sustituye por porciones iguales de vino, continuando la fermentación indefinidamente (Hernández, 2003).

Explicando a detalle el equipo utilizado en este método; se emplean toneles o generadores verticales de encina con doble fondo, sobre el primero una serie de capas agujereadas de virutas de madera de haya, impregnadas de vinagre de buena calidad, sobre el borde superior lleva una especie de diafragma perforado, al pasar el vino por el diafragma, burbujea aire que existe entre las virutas para dar la oxigenación necesaria para la acidificación. El vinagre se extrae por la parte inferior, también se pueden emplear barriles de roble giratorias, parcialmente llenos de virutas, consiguiéndose así una mejor aireación. Las ventajas que se destacan de este proceso son la regulación de oxígeno y su uso para la producción continua de vinagre. El vinagre obtenido con el método de cultivo superficial tiene el aroma y el gusto propio de la lentitud de la acetificación que se ve favorecido por el simultáneo envejecimiento (Hernández, 2003).

## **2.6. CONDICIONES ÓPTIMAS DE FERMENTACIÓN ACÉTICA**

Según Llaguno y Polo (1991), la fermentación acética puede ser definida como un proceso bioquímico, por el cual las bacterias acéticas oxidan al etanol contenido en el sustrato alcohólico (en este caso el vino del mucílago del cacao) a ácido acético, bajo estrictas condiciones de aerobiosis. Las condiciones óptimas de fermentación se refieren a la ventaja de conocer la información acerca de la cinética de crecimiento bacteriano y de los procesos automatizados de fermentación.

### **2.6.1. INFLUENCIA DE LA TEMPERATURA**

La temperatura del medio influye sobre el crecimiento de microorganismo, por lo cual se propone una temperatura óptima de fermentación acética comprendida dentro del rango 28-32 °C, sin embargo, cuando la temperatura es superior a 33 °C, ocurre un proceso de desactivación bacteriana, además de aumentar las pérdidas de alcohol y productos volátiles, las enzimas son desnaturaladas, la membrana dañada, causando que los constituyentes se dispersen y el organismo sea más sensible a los efectos tóxicos de la célula y, al disminuir por debajo de 25 °C, también se inhibe gradualmente el desarrollo bacteriano en el proceso (Llaguno & Polo, 1991).

### **2.6.2. INFLUENCIA DE LA AGITACIÓN**

Según Gómez et al (1993) citado en Gómez, Romero, Caro & Cantero (1994), la velocidad de agitación en la fermentación influye directamente sobre el desarrollo del microorganismo, ya que a través de una óptima agitación se logra que el microorganismo capte el oxígeno presente en el medio, las condiciones óptimas de agitación en el proceso según estudios previos del autor es de 400 rpm.

### **2.6.3. INFLUENCIA DE LA AIREACIÓN**

La incorporación de aire es un proceso esencial, dado el carácter aerobio de las bacterias acéticas. Además de la cantidad de aire suministrado, se debe considerar la pureza y calidad de éste, las bacterias acéticas son sensibles a contaminantes presentes en el aire (Llaguno & Polo 1991).

Según Gómez, Romero, Caro & Cantero (1994), en este tipo de fermentaciones, la concentración de oxígeno disuelto es uno de los factores determinantes de la velocidad global del proceso, sin embargo cuando se aborda el modelado cinético de la fermentación acética, se suele evitar la presencia de parámetros relacionados con el oxígeno, de forma que no se han propuesto modelos que incluyan dicha variable con carácter cuantitativo en las ecuaciones cinéticas.

La medida para cuantificar este parámetro se expresa en vvm (volumen de aire por volumen de medio por minuto). Según Gómez et al (1993) citado en Gómez, Romero, Caro & Cantero (1994), las condiciones óptimas de operación en cuanto a la aireación en el proceso es de 0.5 vvm, dicha condición proporciona los máximos valores del coeficiente de transferencia de oxígeno al medio líquido.

## 2.7. MICRORGANISMOS RESPONSABLES DE LA FERMENTACIÓN ACÉTICA

### 2.7.1. ORGANISMOS INICIADORES DE LA PRODUCCIÓN DE VINAGRE.

Los organismos involucrados en la producción de ácido acético, usualmente se desarrollan en un sustrato madre. Están compuestos por bacterias acéticas y por levaduras, las cuales crecen simbióticamente. Las principales especies del género *Acetobacter* productoras de ácido acético son *Acetobacter aceti*, *xylinum* y *ascendens* (Llaguno & Polo, 1991).

La descripción del género *Acetobacter* que se muestra en la Figura 1, señala a las células que van de la forma elipsoidal a la alargada, recta o ligeramente curvadas, encontrándose algunas especies: esféricas, alargadas, hinchadas, curvadas y filamentosas. Móviles o no móviles, si son móviles los flagelos son peritricos o laterales, no forman endosporas, son Gram negativas y en algunos casos Gram variables, son aerobias estrictas por lo que tienen un metabolismo respiratorio en que el oxígeno es el aceptor final de electrones, forman también colonias pálidas, son catalasa positiva y oxidasa negativa, no licuan la gelatina y no forman indol o H<sub>2</sub>S, oxidan el etanol a ácido acético y el acetato y el lactato a CO<sub>2</sub> y H<sub>2</sub>O, el pH óptimo para su crecimiento es de 5,4-6,3, el género *Acetobacter* se encuentra en flores, frutas, vino de uva, sidra cerveza, vinagre, virutas de madera de generadores de vinagre y acetificadores, entre otros (De Ley et al., 1984), la forma microscópica de la bacteria se muestra en la Figura 1 a continuación.



(Science photo library, 2012).

**Figura 1.** Vista microscópica de *acetobacter aceti*.

Según Llaguno y Polo (1991) la producción de ácido acético resulta de una oxidación del etanol por las bacterias acéticas, esto involucra una reacción en dos pasos; en la primera etapa se oxida etanol a acetaldehído y la segunda el acetaldehído a ácido acético, esta oxidación es catalizada por enzimas que se encuentran en la membrana celular, específicamente en la superficie externa de la membrana citoplasmática, en contacto con el medio de cultivo donde el ácido acético se acumula rápidamente. Estas son alcohol deshidrogenasa y aldehído deshidrogenasa, además existen otros dos importantes componentes que actúan en la oxidación de etanol estos son Citocromo C y terminal oxidasa.

## **2.7.2. GENERALIDADES DE LAS BACTERIAS ÁCIDO LÁCTICAS EN FERMENTACIONES ACÉTICAS.**

Las bacterias ácido-lácticas, que oxidan el etanol a ácido acético, pueden existir a valores bajos de pH, así como los cultivos utilizados a niveles industriales se seleccionan en función de que toleren una acidez elevada y de que las velocidades de producción de acetatos sean altas, estas bacterias son extremadamente sensibles y se mueren en ausencia de oxígeno y etanol, esta sensibilidad a la falta de oxígeno aumenta a medida que lo hace la concentración total de ácido acético más etanol. Por otra parte puede ocurrir una sobre oxidación, esto es la conversión de ácido acético en CO<sub>2</sub> y H<sub>2</sub>O, sin embargo puede impedirse manteniendo la concentración de ácido acético por encima del 6 % e impidiendo el agotamiento total de etanol (Hernández 2003).

Según Parés & Juárez, (2012) cita que el conocimiento actual de las bacterias del ácido acético se basa fundamentalmente en los trabajos de Frateur (1960), Asai (1964), De Ley (1970) e Izuka Komasata (1980) y lo reúne detalladamente en la Tabla 1 a continuación:



**Tabla 1.** Características diferenciales de los géneros *Gluconobacter*, *Acetobacter* y *Pseudomonas*.

Características	<i>Gluconobacter</i>	<i>Acetobacter</i>	<i>Pseudomonas</i>
Flagelación	Polar o ninguna	Peritrica o ninguna	Polar
Crecimiento a pH 4,5	+	+	-
Oxidación de:			
Etanol a ácido acético a pH 4,5	+ (M)	+ (F)	-
Ácido acético a CO <sub>2</sub>	-	+	D
Lactato a CO <sub>2</sub>	-	+	+
Glucosa a gluconato	+	d	D
Aminoácidos por células en reposo	-	+	+
Ciclo de Krebs	-	+	+
Producción de 5-cetogluconato	+	d	-
Cetogénesis	+	D	-
Quinonas Q <sub>10</sub>	+	-	
Quinonas Q <sub>9</sub>	-	+	
Hidrólisis de:			
Lactosa y almidón	-	-	D
Gelatina	-/D	-	D
Pigmentos verdoso y/o fluorescentes	-	-	D

\*M, moderado; F, fuerte; D, débil; d, variable según la cepa  
(Parés & Juárez 2012).

### 2.7.3. BACTERIAS ACÉTICAS Y CONDICIONES DEL PROCESO

Esta fermentación se puede efectuar por medio de muchas bacterias y otros tipos de microorganismos con capacidad para producir ácido acético, a partir de varios sustratos que contienen etanol, pero, a escala industrial, se emplean principalmente bacterias del género *Acetobacter*, también conocidas como bacterias acéticas, por su alta capacidad de producción de este metabolito. En la fermentación actúan varias especies de bacterias acéticas, y no una sola de ellas; sin embargo, las que se han detectado en

mayor proporción son *Acetobacter aceti*, *Acetobacter rancens* y *Acetobacter oxydans* (Hernández 2003).

Las características importantes para seleccionar las especies de *Acetobacter*, aptas para la producción de ácido acético son:

- Una tolerancia a altas concentraciones de ácido
- Un bajo requerimiento de nutrimentos
- Una incapacidad de metabolizar el ácido acético (evita la sobre oxidación) (Hernández 2003).

## **2.8. COMPUESTOS AROMÁTICOS EN VINAGRE**

Considerando que los constituyentes volátiles son específicos para algunos vinagres, éstos se pueden determinar por las características de la materia prima utilizada y por la tecnología de procesamiento experimentada durante su producción. Es lógico suponer que los vinagres podrían ser caracterizados y diferenciados por la cantidad y calidad de los análisis de sus componentes volátiles (Castro et al., 2002).

En orden de considerar la calidad de los vinagres han sido usados compuestos volátiles para caracterizar el proceso de acetificación. Los volátiles más característicos son acetaldehído, etil acetato, acetoína, 2-metil-1-butanol y 3-metil-1-butanol (Gerbi, 1995 citado en Pizarro, 2005).

Con el desarrollo de la cromatografía de gases y las técnicas de identificación como espectroscopia infrarroja o de masa, los métodos analíticos han ido mejorando y ahora son más eficientes. En los años 1990 la microextracción en fase sólida (SPME) fue desarrollada como un método rápido y económico que se usa en combinación con la cromatografía de gases y es aplicada a una extensa variedad de componentes, especialmente para la extracción de componentes volátiles (Castro et al., 2002).

### 3. METODOLOGÍA

#### 3.1. OBTENCIÓN DE LA MATERIA PRIMA

Las mazorcas de cacao variedad CCN-51, fueron recolectadas de forma manual, escogiendo los frutos maduros que presentaban características de coloración amarillenta y rojiza de la finca “Zorayda” ubicada en la provincia de Los Ríos, cantón Montalvo, parroquia Sabaneta, recinto Pretoria. Se presentan las condiciones geográficas y climáticas de la zona en la Tabla 2.

**Tabla 2 .** Condiciones Geográficas del cantón Montalvo.

<b>Extensión</b>	364,4 Km <sup>2</sup>
<b>Clima</b>	Húmedo Tropical
<b>Latitud</b>	1° 46' S
<b>Longitud</b>	97° 27' O
<b>Temperatura Máxima</b>	31 °C
<b>Temperatura Mínima</b>	21 °C
<b>Temperatura Media Anual</b>	25.5 °C
<b>Altitud</b>	72 m.s.n.m
<b>Humedad Relativa Anual</b>	80,45%

(Gobierno de la provincia de Montalvo, 2011).

Una vez cosechadas las mazorcas de cacao, se trasladaron vía terrestre hacia la ciudad de Quito en sacos, el material en un tiempo de 8 horas. Al día siguiente se realizó la extracción del mucílago en la Universidad Tecnológica Equinoccial a través del método de “prensado”.

### 3.2. MÉTODO DE EXTRACCIÓN DEL EXUDADO DEL MUCÍLAGO DE CACAO

Según Luzuriaga (2012), el método óptimo de obtención del líquido mucilaginoso de la almendra de cacao es mediante “prensado”. Una vez extraídas las almendras y la placenta del cacao, se empleó un tamiz de acero inoxidable de 35 cm de diámetro, cuya malla tiene orificios circulares de 2 mm de diámetro, donde se colocaron las almendras de cacao y sus respectivas placentas y se sometió una presión con el fin de acelerar el escurrido.

Para determinar la presión necesaria sobre las almendras mucilaginosas para acelerar el escurrido, se realizó el cálculo mediante las siguientes ecuaciones:

$$A = \frac{\pi * D^2}{4} \quad [4]$$

**Dónde:**

A: área

D: diámetro del tamiz

$$P = \frac{F}{A} \quad [5]$$

**Donde:**

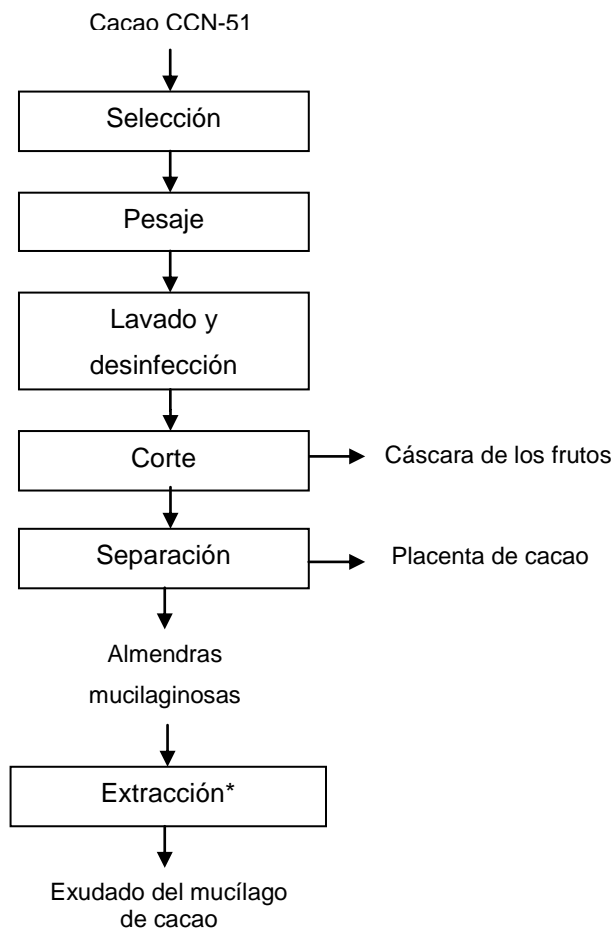
P: presión

F: fuerza

A: área

La presión ejercida fue determinada en relación 1:1 en peso (kg de almendras mucilaginosas: kg peso ejercido).

El procedimiento por el cual se obtuvo el exudado del mucílago del cacao es el óptimo obtenido por Luzuriaga (2012), y se presenta en la Figura 2.



\*Prensado

**Figura 2.** Proceso de extracción del exudado del mucílago del cacao (Luzuriaga 2012).

Las operaciones realizadas en la figura anterior se describen a continuación.

### **3.2.1. SELECCIÓN**

Las mazorcas se seleccionaron de acuerdo a grado de madurez (colores rojizos y amarillentos) y las que no presentaran enfermedades ni defectos físicos provocados por maltratos, cortes inadecuados y lesiones, así como un correcto movimiento interior de las almendras que sugirieran la abundante presencia de líquido mucilaginoso en su interior.

### **3.2.2. PESAJE**

Seleccionadas las mazorcas, se procedió a un pesaje de la mazorca entera de cacao y de cada una de sus partes; cascará, placenta y almendra mucilaginosa respectivamente.

### **3.2.3. LAVADO Y DESINFECCIÓN**

Se lavaron las mazorcas con agua potable y se desinfectaron con agua clorada, utilizando para esto 100 ppm de cloro (hipoclorito de sodio) y posteriormente fueron sometidas a enjuague con agua potable.

### **3.2.4. CORTE**

Para el proceso de corte de las mazorcas, se utilizó un cuchillo de acero inoxidable, realizando cortes longitudinales y transversales.

### 3.2.5. SEPARACIÓN DE ALMENDRAS MUCILAGINOSAS Y PLACENTA

Para la separación de las almendras de la cascara del cacao se realizó de forma manual recolectando la placenta de las almendras mucilaginosas en la prensa, para utilizar el “prensado” como forma de obtención del líquido.

### 3.3. ANÁLISIS FÍSICOQUÍMICO DEL EXUDADO DEL MUCÍLAGO DE CACAO

Para la caracterización fisicoquímica del mucílago de cacao, se envió una muestra de exudado a un laboratorio certificado, donde se realizaron los análisis presentados en la Tabla 3.

**Tabla 3.** Análisis proximal del exudado del mucílago de cacao

PARÁMETRO ANALIZADO	UNIDADES	MÉTODO DE ENSAYO
Sólidos Solubles (°Brix)	%	REFRACTÓMETRO*
Acidez Titulable	%	PEE-LASA-FQ 16
pH	-	pH-METRO*
Proteína	%	PEE-LASA-FQ-11
Humedad	%	PEE-LASA-FQ-10a
Grasa	%	PEE-LASA-FQ-10b
Cenizas	%	AOAC 923.03
Fibra	%	ICC STANDARD 113
Hidratos de Carbono	%	LASA BR01
Energía	Kcal/100 g	LASA BR02
Sólidos Totales	%	AOAC 925.10
Azúcares Totales	%	AOAC 974.06

(LASA, 2011)

Laboratorio de Análisis de Alimentos y Productos Procesados

\*Desarrollados en la Planta Piloto de Alimentos UTE

### 3.4. FERMENTACIÓN ALCOHÓLICA

Se llevó a cabo de acuerdo al tratamiento óptimo según Luzuriaga (2012) ya que este trabajo de investigación es la secuencia del citado. Esta fermentación se obtuvo mediante levaduras *Saccharomyces cerevisiae* y corrección de grados Brix con azúcar.

#### 3.4.1. ADECUACIÓN Y FORMULACIÓN DEL MOSTO PARA LLEVAR A CABO LA FERMENTACIÓN ALCOHÓLICA

La formulación del mosto se basó en el tratamiento óptimo obtenido por Luzuriaga, (2012), el cual se basa en la adición de levaduras, metabisulfito de sodio y azúcar utilizando las unidades que se indican en la Tabla 4.

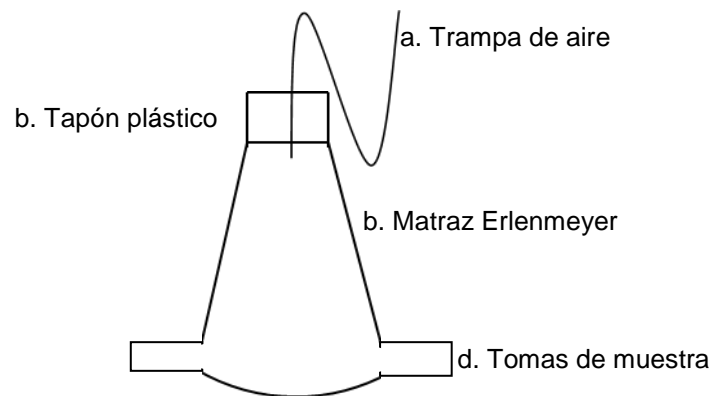
**Tabla 4.** Parámetros de adecuación para el mosto en la fermentación alcohólica.

PARÁMETRO	MEDIDA
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	g/L mosto
pH mosto	pH-metro
Metabisulfito de sodio	g/L mosto
Temperatura de fermentación	°C
Azúcar	g en mosto

Para llevar a cabo la fermentación, se utilizaron dos matraces Erlenmeyer con capacidad para 2,5 L. cada uno, tapados herméticamente y con una trampa de agua mediante el uso de un tubo pyrex, que permitió la salida de



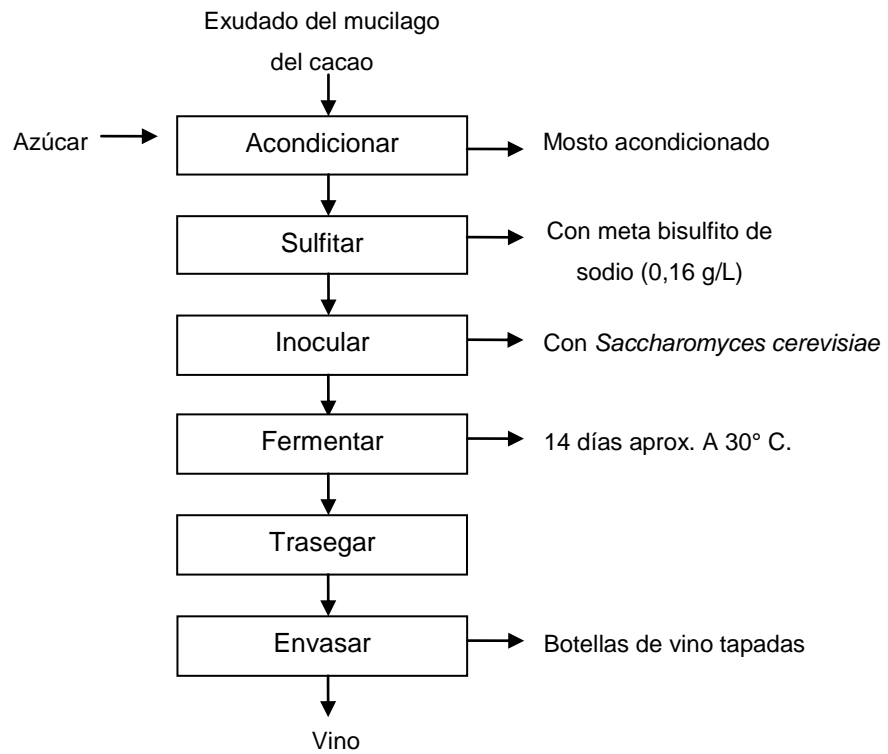
dióxido de carbono producido en la fermentación por la acción de las levaduras en el mosto, el cual a su vez no permite el ingreso de oxígeno. También se implementó una boquilla de salida y entrada en la parte inferior de los matraces (para posterior uso en el desarrollo de la fermentación acética) para la toma de muestras, análisis de las mismas ( $^{\circ}$ Brix, pH) así como facilitar el trasiego del vino para su embotellado, sin los sedimentos formados durante la fermentación, como se muestra en la Figura 3.



**Figura 3.** Esquema del micro fermentador utilizado para la fermentación alcohólica del exudado del mucílago del cacao.

### 3.5. ELABORACIÓN DEL VINO DEL MUCÍLAGO DE CACAO

Este proceso se encuentra descrito en el esquema de la Figura 4. Se realizó controlando el alcohol producido, acidez y los  $^{\circ}$  Brix consumidos.



**Figura 4.** Procedimiento realizado en la elaboración del vino de cacao

Los procesos descritos en el esquema se encuentran resumidos a continuación.

### 3.5.1. ACONDICIONAMIENTO DE MOSTOS

El acondicionamiento se lleva a cabo mediante la adición de azúcar de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$\text{Zumoz} (\text{°Bx}) + \text{Azúcar} (\text{°Bx}) = \text{Mosto} (\text{°Bx}) \quad [5]$$

### **3.5.2. SULFITADO**

La adición de Metabisulfito de sodio, se realizó en las 4 repeticiones (0,16 g/L) (Ruiz, 2011).

### **3.5.3. INOCULACIÓN**

Para la inoculación de las 6 repeticiones, se utilizó levadura seca activa rehidratada marca LEVAPAN en un estándar de 0,15 g/L mosto según Arozarena (2007) consultado en Luzuriaga (2012).

### **3.5.4. FERMENTACIÓN**

Las 4 muestras fueron sometidas a fermentación alcohólica en matraces Erlenmeyer de 2.5 L., controlando la temperatura en estufa marca MEMMERT, modelo UNB-100 instalada en los laboratorios de la Universidad Tecnológica Equinoccial en un periodo promedio de 11 días cada uno.

### **3.5.5. TRASIEGO**

El trasiego se llevó a cabo una vez finalizado el periodo de fermentación, a temperatura ambiente, envasándose en botellas de vino previamente esterilizadas.

### 3.5.6. ENVASADO

El envasado se llevó a cabo en los laboratorios de la Universidad Tecnológica Equinoccial, una vez terminado el proceso de trasiego, se esterilizaron las botellas de vidrio a utilizar y se desinfectaron con agua clorada (100 ppm), posteriormente se cerró con tapones de caucho en forma de corcho regular como muestra la Figura 5.



**Figura 5.** Vino final (sustrato) del mucílago del cacao.

### 3.6. CARACTERIZACIÓN FÍSICO-QUÍMICA DEL VINO DE CACAO

Para la caracterización fisicoquímica del vino del mucílago de cacao, se envió una muestra del vino producido descrito anteriormente a un laboratorio certificado, donde se realizaron los análisis presentados en la Tabla 5.

**Tabla 5 .** Análisis proximal del vino del mucílago de cacao

<b>PARÁMETRO ANALIZADO</b>	<b>UNIDADES</b>	<b>MÉTODO DE ENSAYO</b>
Sólidos Solubles (°Brix)	%	REFRACTÓMETRO*
Acidez Total	(g/L)	NTE INEN360
° GL	%	NTE INEN 341
pH	-	pH-METRO*

(LABOLAB, 2011)

\*Desarrollados en la Planta Piloto de Alimentos UTE

Con estos análisis se pretende conocer las condiciones iniciales del proceso.

### **3.7. OBTENCIÓN CULTIVO MADRE PARA SU UTILIZACIÓN COMO INÓCULO**

Se realizó un picado espontáneo en un vino blanco cepa Chardonnay Blanc marca “Doña Dominga” bajo las siguientes condiciones; en un recipiente con amplia superficie de contacto para la oxigenación, usando tapas de corcho viejas flotando en el medio, tapado con gasas para evitar la contaminación física del cultivo. Basado en el numeral 2.3.3 de este trabajo, el proceso consistió en dejar en reposo el vino para que al cabo de aproximadamente 5 días, las bacterias acéticas creen una película de celulosa en la superficie del vino a acetificar.

A través del incremento diario de la acidez del medio se puede constatar que existe la presencia de bacterias del género *acetobacter* y esto se utilizará como inóculo para la posterior fermentación acética del vino.

### 3.8. ELABORACIÓN DE VINAGRE DE FERMENTACIÓN ACÉTICA DEL VINO DEL EXUDADO DEL MUCÍLAGO DEL CACAO.

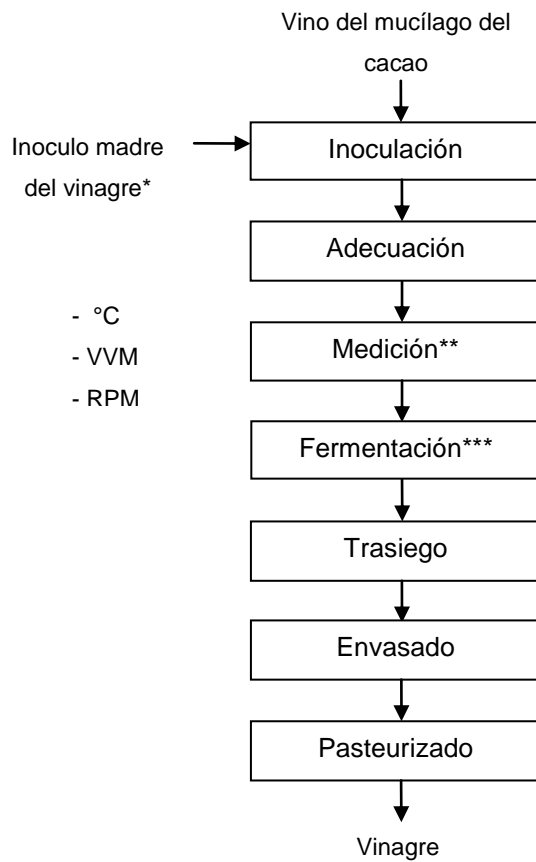
El proceso de elaboración del vinagre a través de la fermentación acética por cultivo sumergido, se describe en la Figura 5. Llevado a cabo de acuerdo a la especificación en los niveles de oxigenación, tiempo y agitación para cada tratamiento como se indica en la Tabla 6:

**Tabla 6.** Condiciones de agitación y oxigenación para cada tratamiento.

TRATAMIENTO	OXÍGENO DISUELTO (h)	AGITACIÓN (rpm)*	VOLUMEN OXÍGENO DISUELTO (vvm)**
1	24 h/día	400	0.5
2	18 h/día	400	0.5
3	12 h/día	400	0.5

\* Revoluciones por minuto

\*\* Volumen de aire por unidad de volumen de medio por minuto.



**Figura 6.** Procedimientos realizados en la elaboración de vinagre del mucílago del cacao.

\* Inoculo utilizado como cultivo sumergido en la fermentación, presencia de bacterias genero *acetobacter*.

\*\* °C (grados centígrados), VVM (Volumen de aire por volumen de solución por minuto y RPM (revoluciones por minuto).

\*\*\* 14 días controlando acidez y temperatura.

Los procesos descritos en el esquema se muestran resumidos a continuación.

### **3.8.1. INOCULACIÓN**

Se inocularon las primeras 2 muestras del vino del mucílago del cacao con el cultivo madre obtenido, para posteriormente inocular consecutivamente los otros 2 tratamientos dejando un volumen aproximado del 15% residual en el mismo matraz, basado en el método Orleans e incrementando la acidez inicial de cada tratamiento.

### **3.8.2. ADECUACIÓN**

Se adecuó la bomba de oxígeno disuelto en el medio a través de un balance de masa conforme al volumen del medio y el volumen máximo según las especificaciones de la bomba, utilizando el vvm óptimo para el proceso, controlando la temperatura de la fermentación y ajustando las rpm del agitador, se dio inicio al proceso de fermentación acética.

### **3.8.3. MEDICIÓN**

Se controló de la mejor manera la temperatura del proceso utilizando lámparas para la generación de calor en las noches y el serpentín de enfriamiento diseñado para evitar que bajar del rango mínimo de crecimiento de la *acetobacter*, así como verificando el correcto funcionamiento de la agitación y recopilando datos sobre el ácido producido diariamente por el proceso.



#### **3.8.4. FERMENTACIÓN**

Las 6 muestras fueron sometidas a una fermentación acética en matraces Erlenmeyer de 2.5 L. cada uno, controlando temperatura, tiempo de exposición al O<sub>2</sub>, agitación y producción de acidez.

#### **3.8.5. TRASIEGO**

El trasiego se llevó a cabo una vez finalizado el periodo de fermentación, a temperatura ambiente, envasándose en botellas de vinagre previamente esterilizadas.

#### **3.8.6. ENVASADO**

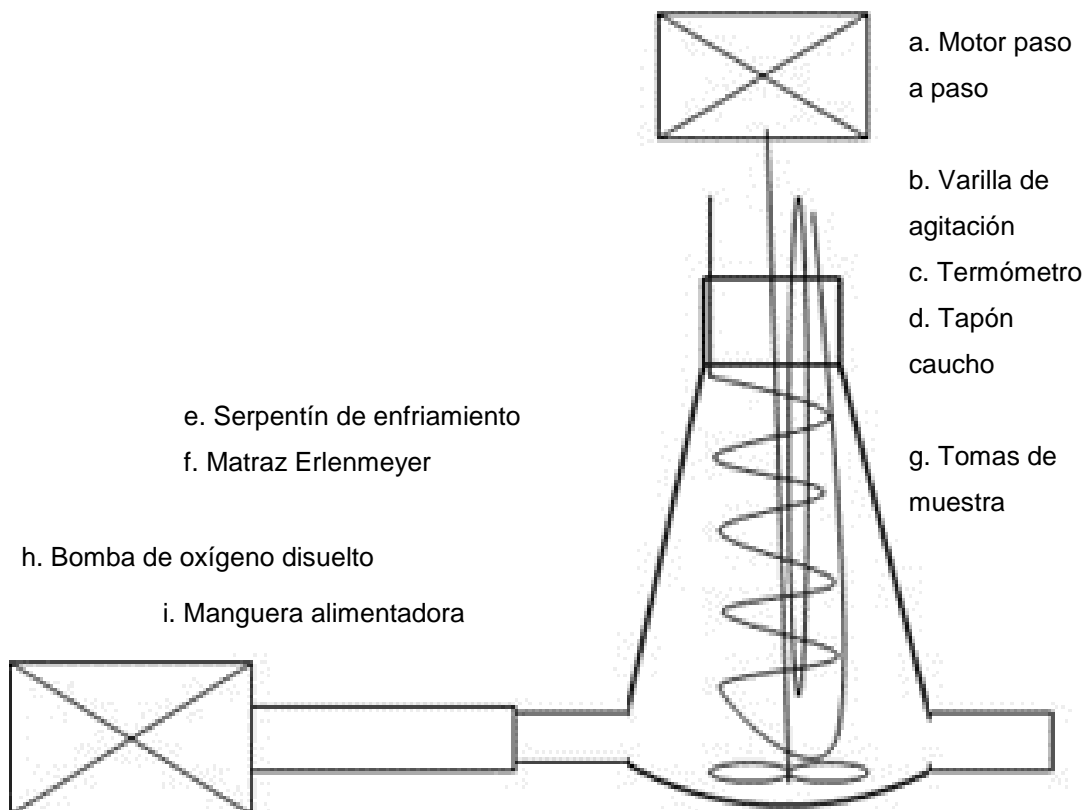
El envasado se realizó una vez terminado el proceso de trasiego, se esterilizaron las botellas de vidrio a utilizar y se desinfectaron con agua clorada (100 ppm), posteriormente se taparon con tapones de caucho en forma de corcho regular.

#### **3.8.7. PASTEURIZADO**

Se pasteurizó el vinagre para inactivar los microorganismos presentes en el producto final y evitar la sobre oxidación y producción de compuestos diferentes a los deseados por 30 minutos a un intervalo de 70-75 °C.

### 3.9. ACETIFICADOR EXPERIMENTAL

Se tomó el método de fermentación sumergida para realizar la investigación, debido a que industrialmente es el método con mejores rendimientos y más utilizado actualmente, para realizar esto se tomó como base el diseño de un acetificador Frings, el cual se adaptó a un modelo piloto, que se consta de los siguientes componentes; matraz Erlenmeyer de 2,5 L. con dos boquillas, una para la toma de la muestra y otra para la entrada de oxígeno a la fermentación, agitador de vidrio, motor paso a paso bipolar de rpm ajustable, bomba de aire con regulador de oxígeno disuelto medido en vvm (volumen de aire por unidad de volumen de medio por minuto), serpentín enfriador de vidrio, termómetro y tapón de caucho con espacio para entrada de agitador, entrada y salida del serpentín, entrada de termómetro y salida de compuestos volátiles el cual se muestra en la Figura 7.



**Figura 7.** Esquema del acetificador experimental diseñado para el proceso de fermentación acética del vino del exudado del mucílago del cacao.

Los componentes del acetificador experimental se detallan a continuación:

### **3.9.1. MATRAZ ERLENMEYER**

Se utilizaron dos matraces Erlenmeyer de 2.5 L. cada uno, adaptados con dos boquillas, para la entrada de oxígeno y toma de muestra respectivamente, el tapón de caucho cerrado herméticamente con cinco orificios; entrada y salida serpentín de enfriamiento, entrada de agitador, entrada de termómetro y salida de elementos volátiles de la fermentación.

El matraz es graduado y de material pyrex, que permite trabajar a diferentes temperaturas y posee una resistencia para evitar quebraduras entre otras.

### **3.9.2. MOTOR DE AGITACIÓN**

Se utilizó un motor paso a paso bipolar, marca BROTHER modelo bp2035189 adecuado por el Ing. Eléctrico Bernard Herrera Sokoup, docente de la Universidad San Francisco, permitiendo la regulación a 400 rpm, basándose en el trabajo cinética de crecimiento de acetobacter-aceti sobre sustrato alcohólico, especificado en el numeral 2.6.2 de este trabajo.

### **3.9.3. AGITADOR**

Se diseñó de acuerdo a los requerimientos del matraz, lo cual fue con la paleta de agitación móvil para facilitar la entrada al matraz y su adecuada limpieza, se lo realizó en vidrio de material pírex con un diámetro de 5 cm

para posteriormente conectarla al motor de agitación y pasar por el medio del serpentín de enfriamiento.

#### **3.9.4. SERPENTÍN DE ENFRIAMIENTO**

Para facilitar el uso, lavado y adaptabilidad del sistema de enfriamiento, se diseñó en forma de espiral en vidrio, de modo que, pudiera pasar el agitador por el medio sin rozar el mismo y a su vez corriera el agua fría para controlar el proceso fermentativo, recestando el agua por la primera boquilla y evacuar por la segunda, utilizando la fuerza de gravedad.

#### **3.9.5. BOMBA DE OXÍGENO**

Se utilizó una bomba marca SOBO modelo Aquarium Air Pump SB 748, la misma posee 2 salidas de aire, ajuste del volumen de aire (máximo 3.5 L/min), lo cual permitió mantenerla a 0.5 vvm que como se menciona en el numeral 2.6.3 es el óptimo para el desarrollo de las cepas de *acetobacter* en el fermentador.

#### **3.9.6. BOMBA DE AGUA**

Se utilizó una bomba de agua sumergible marca JAD modelo SP-600, la cual permitió la recirculación del agua del sistema de enfriamiento, posibilitando elevar el agua al tanque alimentador del sistema, todo esto para evitar el desperdicio ocasionado por un circuito abierto, para esto se utilizaron dos

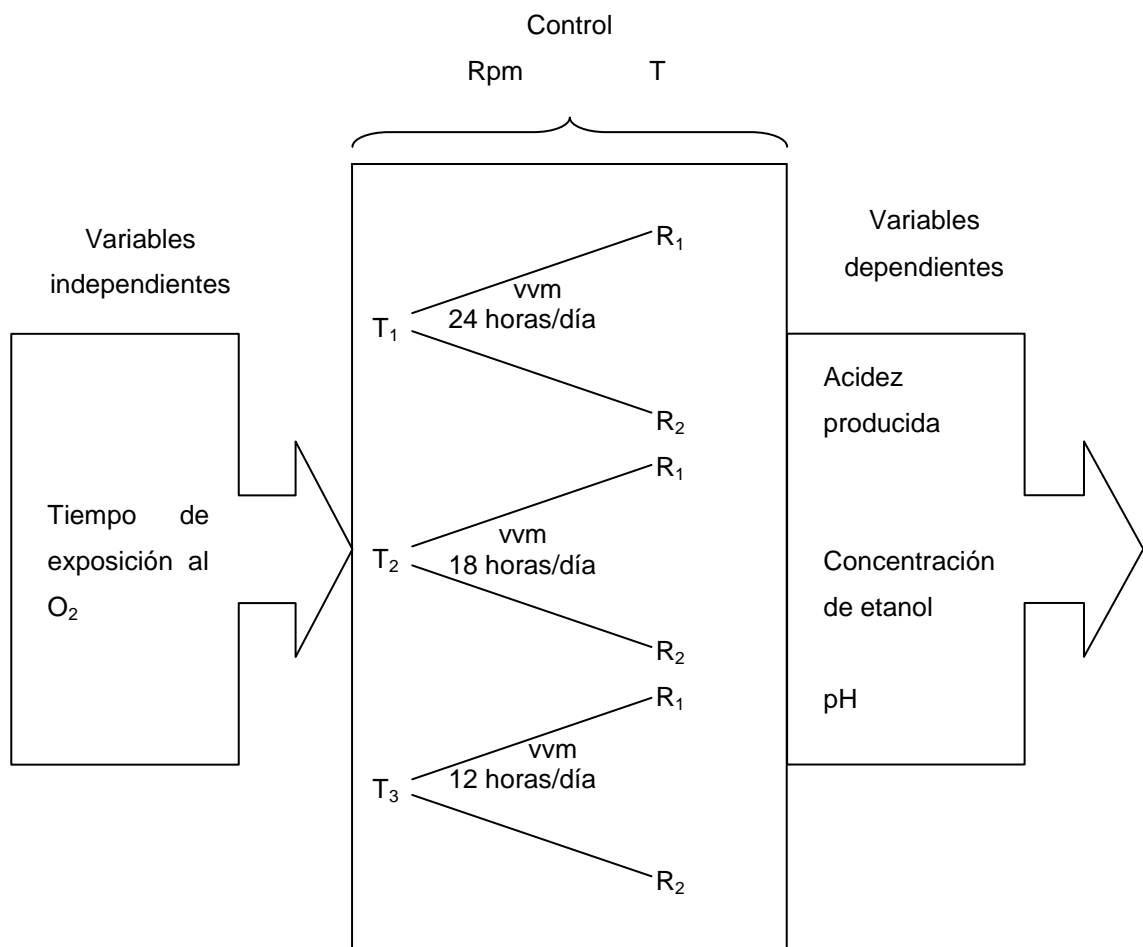
tanques de almacenamiento de agua de diferentes capacidades, el alimentador de 20 L. y el receptor de 8 L. instalando la bomba en el receptor para cerrar el circuito regresando el agua que captó el calor al alimentador, donde por su capacidad se enfría a temperatura ambiente.

### **3.9.7. TEMPERATURA**

Se controló utilizando lámparas eléctricas apuntadas hacia el biorreactor para evitar el descenso de temperatura sobre todo en las noches, buscando controlar en un intervalo de 28-33 °C.

### **3.10. DISEÑO EXPERIMENTAL.**

Para esta investigación se utilizó un diseño simple del efecto de un solo factor como la exposición al O<sub>2</sub> en 3 niveles/tratamientos, llamándose de este punto en adelante; T1= 24 horas, T2= 18 horas y T3= 12 horas de tiempos de aireación diferentes con 2 réplicas cada uno, para conocer el efecto sobre las características fisicoquímicas y sensoriales del vinagre contando con un cultivo de cepas de bacterias *Acetobacter* sumergido, desarrollado en condiciones ideales para la reproducción por medio del método Orleans, obteniendo el inóculo denominado “madre del vinagre”. Cada repetición fue realizada en condiciones de fermentación acética como velocidad de agitación, enfriamiento y temperatura similares, como se gráfica en la Figura 8.



**Figura 8.** Diseño experimental

### 3.11. CARACTERIZACIÓN FÍSICO QUÍMICA DEL SUSTRATO (VINO DEL MUCÍLAGO DEL CACAO).

Se caracterizó el sustrato para conocer las condiciones iniciales ideales del proceso de acuerdo a los análisis realizados. Para esto se envió al laboratorio LABOLAB para llevar a cabo pruebas de Acidez Total y °GL, como se detalla en la tabla 7.

**Tabla 7 .** Análisis Físico-Químico del Sustrato.

PARÁMETRO ANALIZADO	UNIDAD	REQUISITO DE LA NORMA INEN 374		MÉTODO DE ANÁLISIS
		MIN	MAX	
Grado Alcohólico a 15 °C	°GL	5	18	INEN 360
Acidez Total (ácido acético)	g/L AA	---	2.0	INEN 341

(LABOLAB, 2012)

### **3.12. LEVANTAMIENTO DE DATOS DE LA FERMENTACIÓN ACÉTICA DEL VINO DEL MUCÍLAGO DEL CACAO**

Se realizó una medición de acidez diaria para obtener datos para una posterior evaluación estadística de los diferentes tratamientos, así como para llevar a cabo el control durante el proceso.

#### **3.12.1. DETERMINACIÓN DE ACIDEZ**

Para la determinación de la acidez, expresada como ácido acético según MÉTODO AOAC 930.35, se utilizó como reactivo hidróxido de sodio (NaOH) al 0.5% mol y fenolftaleína para titular la muestra, por medio de una pipeta graduada de 10 ml. y un matraz Erlenmeyer mas pequeño, se realizó en el lugar donde la fermentación se llevaba a cabo.

### **3.12.2. DETERMINACIÓN PH**

Se utilizó un ph-metro EBRO ST1000 para determinar el pH del vinagre.

### **3.12.3. DETERMINACIÓN DE ETANOL**

Se obtuvieron 2 variables, el teórico tomando como base la producción de ácido acético medida, como se explica en el numeral 2.5.2 de este trabajo y el final se determinó a través de un análisis fisicoquímico del vinagre final en un laboratorio particular (LABOLAB) bajo la Norma INEN 360.

## **3.13. ANÁLISIS SENSORIAL DEL VINAGRE DEL VINO DEL CACAO**

Para la evaluación sensorial del vinagre se buscó consumidores habituales de vinagre de vino y que hayan probado el fruto como tal para poder distinguir sabores aromas y colores propios del fruto.

Para determinar la aceptabilidad del vinagre obtenido, se realizó a 60 panelistas no entrenados, consumidores habituales de vinagre utilizando la encuesta, como se muestra en el anexo 6 de este trabajo a través de una prueba de aceptabilidad sensorial por atributos.

Se presentó a los panelistas las muestras de los 3 tratamientos del vinagre debido a que estos cumplieron los parámetros requeridos por la norma INEN 2296. Los panelistas evaluaron los atributos: apariencia, olor, color, sabor,



acidez, sabor a cacao y aceptabilidad general, para esto se diseñó una ficha de análisis sensorial, la cual se muestra en el anexo 6.

Los datos captados a través de esta evaluación sensorial, son tabulados en el anexo 7, para su análisis de varianza ANOVA Multifactorial de bloques, utilizando la prueba “DMS” con un nivel de confianza del 95%, mediante el programa estadístico STATGRAPHICS Centurion XVI.I desarrollado por Statistical Graphics Corporation.

Esta evaluación fue realizada en las instalaciones de la Universidad Tecnológica Equinoccial en el laboratorio de Análisis Químico de Alimentos, en el cual se encuentran los paneles apropiados para analizar cada muestra como se muestra en el anexo 1, los panelistas en su mayoría estudiantes de la carrera de Ingeniería de Alimentos siguiendo las instrucciones probaron las 3 muestras analizando lo que se pedía, se determinó contar con un panel de 60 integrantes.

## 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 4.1. CARACTERIZACIÓN FÍSICO QUÍMICA DEL CACAO

Los resultados obtenidos en la extracción del mucílago del fruto de cacao y sus partes constitutivas, de acuerdo al procedimiento indicado en el numeral 3.1.2 de este trabajo, son los mostrados en la tabla 8.

**Tabla 8.** Pesos promedio del fruto de cacao y sus partes constitutivas.

Elemento	Peso Promedio* (Kg)	Porcentaje (%)
Fruto	2.63	100
Cáscara	1.59	60.46
Almendras	0.89	33.84
Placenta	0.15	5.70

\* Promedios obtenidos de un tamaño de muestra n = 160 mazorcas

### 4.2. CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS DEL EXUDADO DEL MUCÍLAGO DE CACAO

El resultado del análisis físico-químico y proximal realizado al líquido exudado del mucílago de cacao, son los siguientes; como se presenta en la Tabla 9.

**Tabla 9.** Resultados del análisis Físico-Químico y Proximal del Exudado del Mucílago de Cacao.

PROGRAMA DE EXAMEN	UNIDADES	RESULTADO	MÉTODO DE ENSAYO
Sólidos Solubles (°Brix)	%	17	REFRACTÓMETRO*
Acidez Titulable	%	1,0	PEE-LASA-FQ 16
pH	-	3,59	pH-metro*
Proteína	% (f6,25)	0,4	PEE-LASA-FQ-11
Humedad	%	86,5	PEE-LASA-FQ-10 <sup>a</sup>
Grasa	%	0,1	PEE-LASA-FQ-10b
Cenizas	%	0,3	AOAC 923.03
Fibra	%	0,1	ICC STANDARD 113
Hidratos de Carbono	%	12,6	LASA BR01
Energía	kcal/100 g	52,9	LASA BR02
Sólidos Totales	%	13,5	AOAC 925.10
Azúcares Totales	%	16,5	AOAC 974.06

(LASA, 2011).

Laboratorio de Análisis de Alimentos y Productos Procesados

\*Desarrollado en la Planta Piloto de Alimentos UTE

### 4.3. EXTRACCIÓN Y ACONDICIONAMIENTO DEL LÍQUIDO DEL MUCÍLAGO DEL CACAO

Extrayendo el exudado del mucílago de cacao por el método óptimo de extracción como se indica en el numeral 3.2 de este trabajo, del total de 13.06 L se repartió en 6 diferentes muestras de 2180 ml de líquido mucilaginoso para elaborar en los matraces Erlenmeyer dispuestos para la investigación y de acuerdo al método óptimo de fermentación, desarrollado por Luzuriaga (2012).

El posterior acondicionamiento de los mostos, se lo realizó por igual de acuerdo a la ecuación 4:

$$\text{Zum}o (\text{°B}x) + \text{Azú}car (\text{°B}x) = \text{Most}o (\text{°B}x) \quad [4]$$

Así: para 2200 g de muestra de 17 °Bx, se necesitaron 141 g de azúcar para elevar los °Bx a 22, como lo muestran los datos obtenidos en la Ecuación 5.

$$2200 \text{ g} (0.17) + A(1) = \text{Mosto}(0.22) \quad [5]$$

$$374 \text{ g} + A = (2200 \text{ g} + A)(0.22)$$

$$374 \text{ g} + A = 484 \text{ g} + 0.22 A$$

$$1 A - 0.22 A = 484 \text{ g} - 374 \text{ g}$$

$$0.78 A = 110 \text{ g}$$

$$A = \frac{110 \text{ g}}{0.78}$$

$$A = 141 \text{ g}$$

#### 4.4. ELABORACIÓN DEL MOSTO PARA LA FERMENTACIÓN ALCOHÓLICA

La formulación del mosto se basó en el tratamiento óptimo obtenido por Luzuriaga, D. (2012) en el mismo que se adicionó levaduras *Saccharomyces cerevisiae* y la corrección de °Brix como se indica en la Tabla 10.

**Tabla 10.** Parámetros iniciales del proceso de fermentación alcohólica.

PARÁMETRO	CANTIDAD	
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	0.15*	g/L mosto
pH mosto	3.79 ± 0.3	En todas las muestras
°Brix	14	En todas las muestras
Meta bisulfito de sodio	0.16**	g/L mosto
Temperatura de fermentación	25.5	°C. Constante en todas las muestras
Azúcar	141***	g. en 2,2 L. de mosto (17°Bx)

\* (Arozarena, 2007) citado en Luzuriaga, D. (2012)

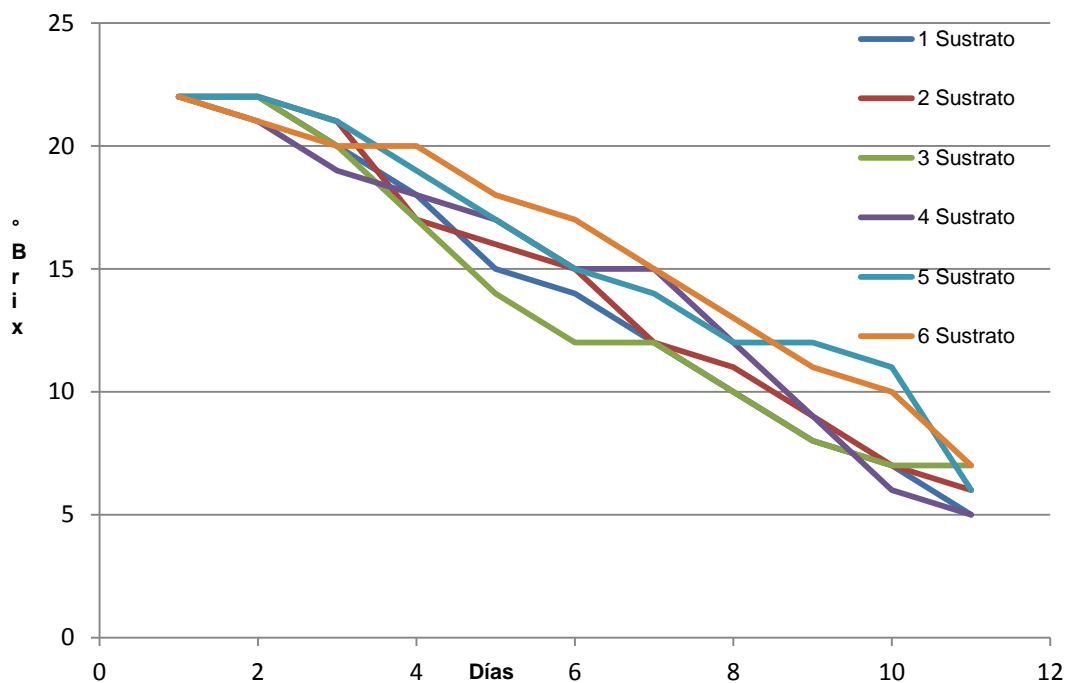
\*\* (Ruiz, 2011) citado en Luzuriaga, D. (2012)

\*\*\* De acuerdo al numeral 4.3 del presente trabajo.

#### 4.5. FERMENTACIÓN DEL VINO DE CACAO CCN-51

El resultado de la fermentación alcohólica del mucílago del cacao son similares a los establecidos por la investigación de Luzuriaga (2012).

Las fermentaciones realizadas, se las hicieron bajo las mismas condiciones variando características fisicoquímicas de la materia prima (exudado del mucílago del cacao), como la acidez inicial y el pH; igualmente a los 12 días de fermentación, todos los sustratos alcanzaron similares variables de respuesta, teniendo un consumo de sólidos solubles parecido como se aprecia en la Figura 9.



**Figura 9.** Cinética de fermentación alcohólica del exudado del mucílago de cacao CCN-51 para las 6 repeticiones.

#### 4.6. CARACTERIZACIÓN FÍSICO-QUÍMICA DEL SUSTRATO

El resultado del análisis de las propiedades químicas, realizadas al Vino de Cacao (sustrato), presentan las siguientes características, como lo muestran los datos obtenidos en la Tabla 11.

**Tabla 11** . Resultado del Análisis Físico-Químico del Vino de Cacao

PARÁMETRO ANALIZADO				
Muestra	Grado Alcohólico* a 15 °C (°GL)		Acidez Total** (ácido acético) (g/L)	
	MIN	MAX	MIN	MAX
1	5	18	-	2
	7.1		1.44	

(LABOLAB, 2012)

\* Método de análisis: INEN 360; \*\* Método de análisis: INEN 341.

Resultando muy similares a los obtenidos por Luzuriaga (2012) mediante el proceso óptimo planteado, mismo que fue utilizado en el presente trabajo de investigación.

#### 4.7. OBTENCIÓN DEL CULTIVO MADRE DEL VINAGRE

Después de utilizar el método de picado acético espontaneo como se detalla en el numeral 3.7 del presente trabajo, se observó que al quinto día del vino en reposo, se generó una película en la superficie del vino, así como el incremento gradual en la acidez del mismo como se indica en la Tabla 12.

**Tabla 12.** Acidez total medida en la madre del vinagre.

<b>INOCULO</b> <b>(Madre del vinagre)</b>	<b>ACIDEZ</b> <b>(g/l)</b>
Día 1	1.6 ± 0.082*
Día 2	1.7 ± 0.064*
Día 3	1.9 ± 0.046*
Día 4	2.1 ± 0.032*
Día 5	2.2 ± 0.014*

$\bar{x} \pm \sigma$  (n=5)

\*Método de análisis INEN 341

#### **4.8. ADECUACIÓN DEL INÓCULO PARA SU UTILIZACIÓN COMO CULTIVO SUMERGIDO**

Una vez obtenida la película generada en el vino, y confirmada la presencia de bacterias en el mismo, a través del incremento gradual en la acidez del inóculo se sembró en el sustrato.

#### **4.9. ACOMPLAMIENTO DEL SUSTRATO CON EL CULTIVO SUMERGIDO**

Por medio de los resultados de los análisis fisicoquímicos del vino del exudado del mucílago del cacao, se procedió a inocular el vino con el cultivo obtenido. Midiendo las condiciones iniciales de acidez y pH de cada réplica como se indica a continuación.

#### 4.9.1. MEDICIÓN DE PH

La determinación de pH para los diferentes sustratos se lo realizó en la planta piloto de la Universidad Tecnológica Equinoccial, teniendo como resultado los que se indican en la Tabla 13.

**Tabla 13.** pH de los sustratos.

<b>SUSTRATO (vino del exudado)</b>	<b>pH</b>
Sustrato 1	3.5
Sustrato 2	3.2
Sustrato 3	3.6
Sustrato 4	3.3
Sustrato 5	3.5
Sustrato 6	3.2

La medición del pH para los diferentes sustratos no se encuentra dentro del rango óptimo establecido 5,4-6.3 (De ley et al, 1984) sin embargo, las bacterias ácido-lácticas que oxidan el etanol a ácido acético, pueden existir a valores bajos de pH (Hernández 2003).

#### 4.9.2. MEDICIÓN ACIDEZ DEL SUSTRATO CON INÓCULO

Se lo realizó bajo el método indicado en el numeral 3.6.1.1 de este trabajo, en el lugar en el que dio inicio la fermentación acética.



Para las primeras dos réplicas inoculadas se muestra un ligero incremento de la acidez con respecto a la acidez inicial del sustrato y posteriormente al dejar aproximadamente un 10% del volumen al final de cada fermentación (la cual sirvió como inóculo para el siguiente tratamiento), es por eso que la acidez inicial de cada tratamiento es diferente a la reportada en el numeral 4.6 de este trabajo, esto se detalla en la Tabla 14.

**Tabla14 .** Acidez total medida de cada muestra a fermentar.

<b>REPLICA (sustrato + inóculo)</b>	<b>TRATAMIENTO</b>	<b>ACIDEZ TOTAL INICIAL</b>
Réplica 1	1	1.64 (g/L)
Réplica 2	1	1.64 (g/L)
Réplica 3	2	1.74 (g/L)
Réplica 4	2	1.74 (g/L)
Réplica 5	3	1.88 (g/L)
Réplica 6	3	1.88 (g/L)

#### **4.9.3. ADAPTACIÓN DE LAS CONDICIONES DE FERMENTACIÓN ACÉTICA PARA CADA TRATAMIENTO**

Una vez dispuesto cada matraz Erlenmeyer con el sustrato más el inóculo, se adecuó la presión de oxígeno a 0.5 vvm, se reguló la agitación a 400 rpm y se midió la temperatura de la fermentación y del entorno continuamente, se dispuso de acuerdo al diseño experimental en tres tratamientos a diferentes niveles de tiempos de oxigenación (T1=24 h, T2=18 h y T3=12 h), fermentado en el acetificador piloto diagramado en el numeral 3.8 de este trabajo.



**Figura 10.** Fermentación acética del vino del mucílago del cacao en proceso.

Como se muestra en la Figura 10, la falta de un control automático en el proceso en cuanto al rango de temperatura, así como el poco volumen de la fermentación, permitieron el descenso de la temperatura en la noche, el experimento llegó a niveles no deseados (10°C), lo cual pudo haber afectado al desarrollo propicio de bacterias en la misma.

#### **4.10. FERMENTACIÓN ÁCIDO ACÉTICO DADA AL VINO DE MUCÍLAGO DE CACAO CCN-51**

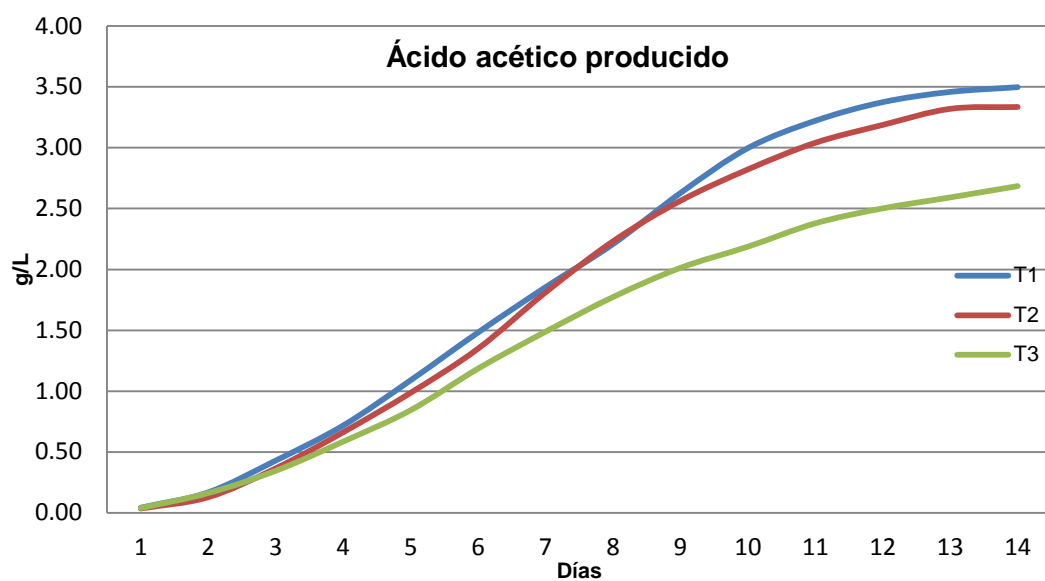
El proceso de fermentación ácido acética concluyó debido al estancamiento de la producción de ácido acético; esto debido al agotamiento del etanol en el medio o por la inactivación de las bacterias, la discusión se expondrá a continuación.

En el decimocuarto día de fermentación, en todos los tratamientos existía una producción del 0.3 g/L (casi nula) respecto a los máximos de producción, esto se debió principalmente a un agotamiento del sustrato alcohólico, ya que si bien Hernández (2009) indica que por cada mililitro de alcohol presente en el sustrato se obtiene un gramo de ácido acético, tomando como referencia la estequiometría de la reacción nombrada en el numeral 2.4.2 de este trabajo, se debió haber contar con un volumen equivalente 1:1 de ácido acético (7.1 g/L) producido con respecto a los ml iniciales de etanol, lo cual no ocurrió de esta manera, ya que una posible evaporación del alcohol pudo haber afectado al proceso, dada por la volatilidad del mismo, provocado por la agitación constante durante el proceso y un defectuoso control en la temperatura del proceso.

La poca producción de ácido acético y el lento consumo de etanol por parte de las bacterias, también se puede explicar debido a que no se caracterizó el tipo de *acetobacter* presente en la fermentación, si bien ocurrió una producción de ácido acético (respaldada por el consumo de etanol y el número de oxidación contenidos en el análisis fisicoquímico mostrado en el numeral 4.11 de este trabajo), pudieron no adaptarse adecuadamente al medio e inactivarse por agotamiento de nutrientes específicamente etanol, ya que las bacterias acéticas se mueren en ausencia de etanol (Hernández, 2003).

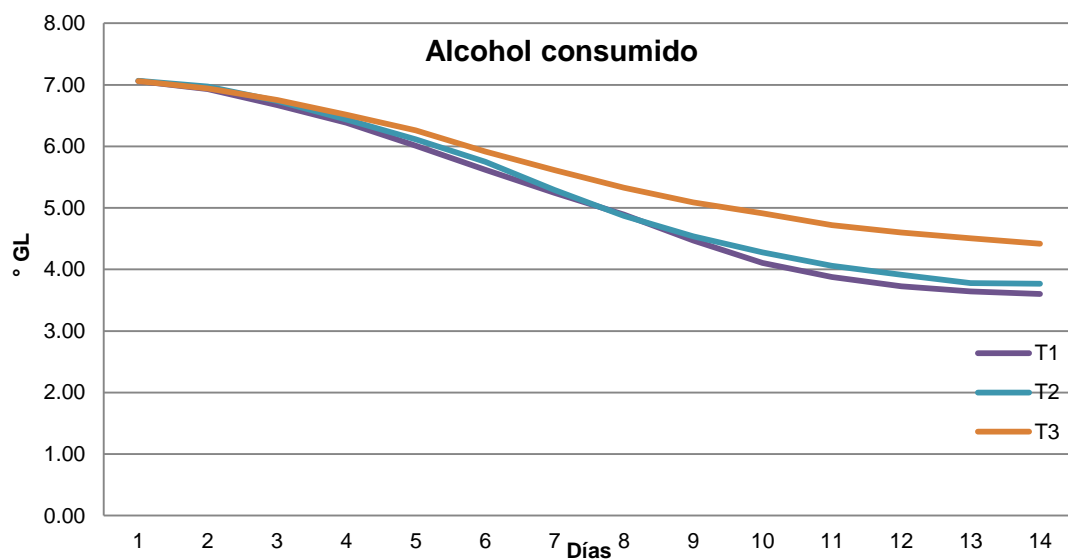
#### **4.10.1. ANÁLISIS DE CURVAS DE FERMENTACIÓN**

Como se muestra en la Figura 11 la producción de ácido acético fue similar en los 3 tratamientos, diferenciándose el T1 (24 h) con respecto al T2 (18 h) en el día 8 de fermentación, alcanzando 3.5 g/L de producción final.



**Figura 11.** Cinética de fermentación (ácido acético) para cada uno de los tratamientos.

El consumo teórico de etanol en la fermentación se muestra en la Figura 12.



**Figura 12.** Cinética de fermentación (sustrato consumido) para cada uno de los tratamientos.

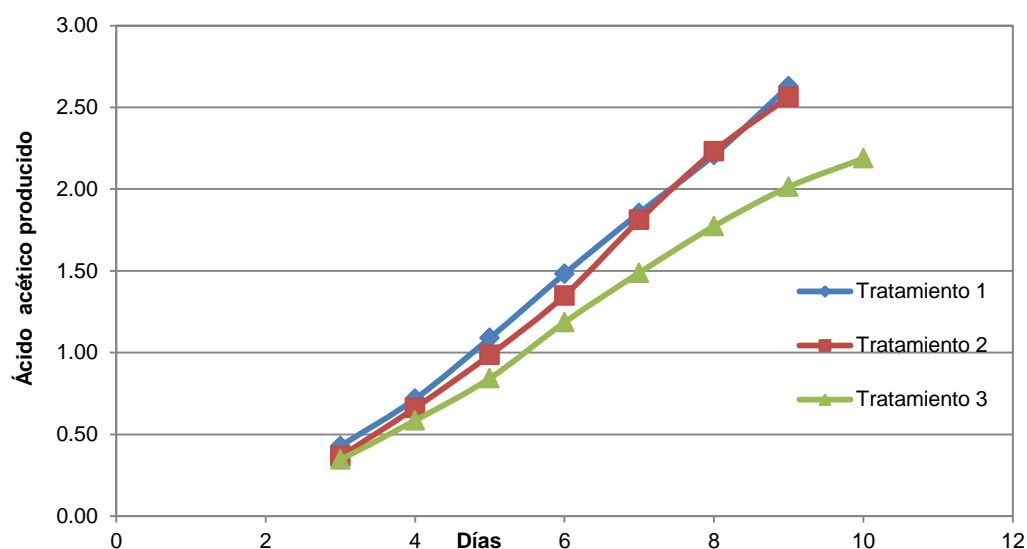
El consumo de alcohol en la fermentación se obtuvo teóricamente ya que partiendo de que por cada mililitro de alcohol presente en el jugo alcohólico se formara un gramo de ácido acético; la suma de la concentración de alcohol (v/v) y de ácido acético (p/v) permanece constante durante toda la fermentación (Hernández 2003).

Se puede observar que los 3 tratamientos se comportan de manera similar en cuanto al consumo de etanol por parte de las bacterias acéticas y que a los 11 días de fermentación muestran un comportamiento lineal.

El T1 (24h) fue el de mayor consumo alcanzando 3.5 ° GL finales de consumo y 3.5 ° GL residuales, esto debido a una mayor concentración de oxígeno disuelto en la fermentación, pero en el análisis físico químico realizado al vinagre final, muestra una ausencia de alcohol residual en el producto, por lo cual se puede deducir que se volatilizó o se consumió en el proceso.

#### **4.10.2. ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LAS GRADIENTES DE FERMENTACIÓN**

En la cinética de fermentación se muestra claramente una sección lineal de fermentación en el proceso, cuya gradiente es diferente para cada uno de los tratamientos, por lo que en la Figura 13 y 14 se analizará la misma utilizando los datos mostrados en el Anexo3.



T1:  $y = 0.3694x - 0.7299$ ;  $R^2 = 0.9985$ , T2:  $y = 0.3771x - 0.8389$ ;  $R^2 = 0.9956$ ,  
T3:  $y = 0.2753x - 0.4872$ ;  $R^2 = 0.9951$ .

**Figura 13.** Gradiente de ácido acético producido/día según tratamientos

Como se observa en la Figura 13, la producción de ácido acético en los 3 tratamientos es similar entre sí, el T1 fue el de mayor producción final (3.5 g/L.), pero no el de mayor pendiente, muestra diferencias estadísticamente significativas con respecto al T3 pero no con el T2 como se muestra en Tabla 15.

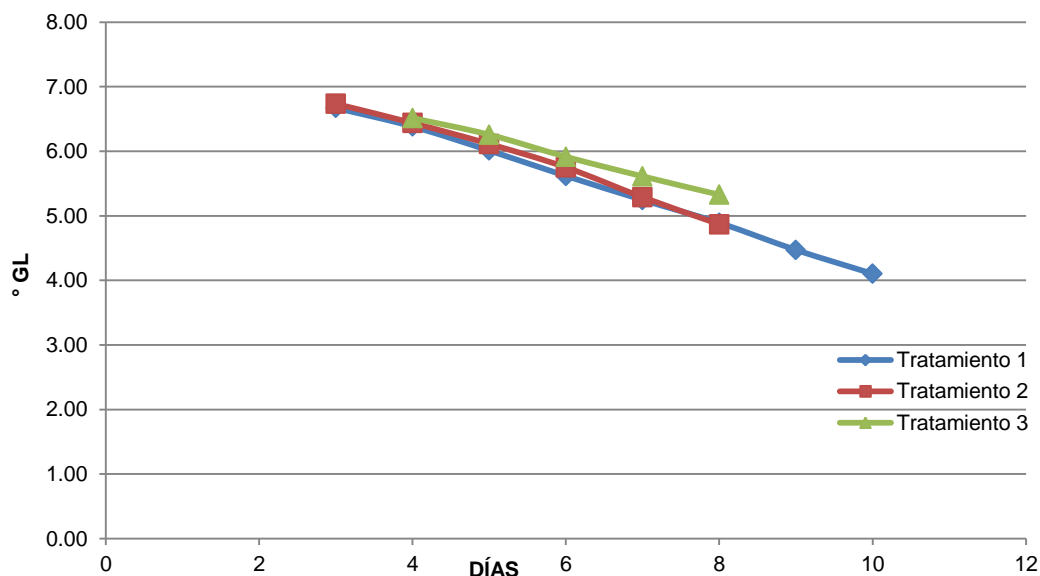
**Tabla 15.** Gradiente de ácido acético producidos/día según tratamiento.

Tratamientos	Gradiente °Bx
T1	$0.369 \pm 0.91^a$
T2	$0.377 \pm 0.70^a$
T3	$0.275 \pm 0.48^b$

$\bar{x} \pm \sigma$  (n=8)

Letras distintas, indican diferencias estadísticas significativas ( $p < 0.05$ ).

El coeficiente de correlación múltiple ( $R^2$ ), denota que mientras más se acerque el valor a 1, mayor es la relación entre el ácido acético y la producción diaria por lo que analizando este valor el T1 (0.9985) demuestra una mayor confiabilidad en cuanto a esta relación.



T1:  $y = -0.3721x + 7.8434$ ;  $R^2 = 0.9989$  T2:  $y = -0.3754x + 7.9309$ ;  $R^2 = 0.993$

T3:  $y = -0.3021x + 7.7378$ ;  $R^2 = 0.9985$ .

**Figura 14.** Gradiente de ° GL consumidos/día según tratamientos

Como se observa en la Figura 14, el T1 que fue el de mayor consumo final muestra una diferencia al T3 pero no con respecto al T2 según los datos mostrados en la Tabla 16.

Por lo tanto se tiene que en cuanto a un posible agotamiento del sustrato, en el T1 y T2 existió una mayor actividad teórica de las bacterias, pero en cuanto al análisis del coeficiente de correlación múltiple ( $R^2$ ) la confiabilidad de los 2 tratamientos en cuanto al consumo de alcohol es prácticamente igual.

**Tabla 16.** Gradiente de ° GL consumidos/día según tratamiento.

Tratamientos	Gradiente °Bx
T1	-0.372 ± 0.80 <sup>a</sup>
T2	-0.375 ± 0.82 <sup>ab</sup>
T3	-0.302 ± 0.68 <sup>b</sup>

$\bar{x} \pm \sigma$  (n=8)

Letras distintas, indican diferencias estadísticas significativas (p<0.05).

#### 4.11. ANÁLISIS FÍSICOQUÍMICO DEL VINAGRE DE CACAO CCN-51.

El resultado de los análisis de las propiedades químicas, realizadas al vinagre de cacao para cada uno de los 3 tratamientos, presentan las siguientes características mostrados en la tabla 17.

**Tabla 17.** Resultado del Análisis Físicoquímico del Vinagre del Vino de Cacao para los 3 Tratamientos.

Tratamientos	PARÁMETRO ANALIZADO							
	Alcohol etílico a 20 °C (° GL)		Acidez Total (ácido acético) (g/L)		Número de oxidación con permanganato		pH a 20 °C	
	Requisito de la norma INEN 2296		Requisito de la norma INEN 2296		Requisito de la norma INEN 2296		Requisito de la norma INEN 2296	
	MIN	MAX	MIN	MAX	MIN	MAX	MIN	MAX
	-	1,0	4	6	3	-	2.3	2.8
T1*	0.00		4.05		19.10		2.6	
T2*	0.00		4.00		15.50		2.4	
T3*	0.00		4.00		17.75		2.7	

(LABOLAB, 2012)

Laboratorio de Análisis de Alimentos y Productos Procesados

\*T1 equivale al inciso C según los datos reportados en la hoja de los análisis del laboratorio anexo 15.

\*T2 equivale al inciso B según los datos reportados en la hoja de los análisis del laboratorio anexo 16.

\*T3 equivale al inciso A según los datos reportados en la hoja de los análisis del laboratorio anexo 17.



Se observa de acuerdo a la tabla anterior el decremento del pH inicial en los 3 tratamientos, que indican la oxidación del etanol, así como la acidez total del producto, dentro del rango permitido por la norma INEN 2296.

El índice de oxidación de determina cuantos compuestos volátiles que se encontraban en el mosto se oxidaron por lo que de acuerdo a los resultados obtenidos, se evidencia la oxidación del alcohol volátil en la fermentación.

#### 4.12. ANÁLISIS SENSORIAL DEL VIANGRE DEL VINO DEL CACAO

Se realizó la evaluación sensorial a cada una de las muestras, debido a que todas cumplieron con los parámetros que se estipulan en dicha norma como lo muestran los datos obtenidos en la Tabla 17.

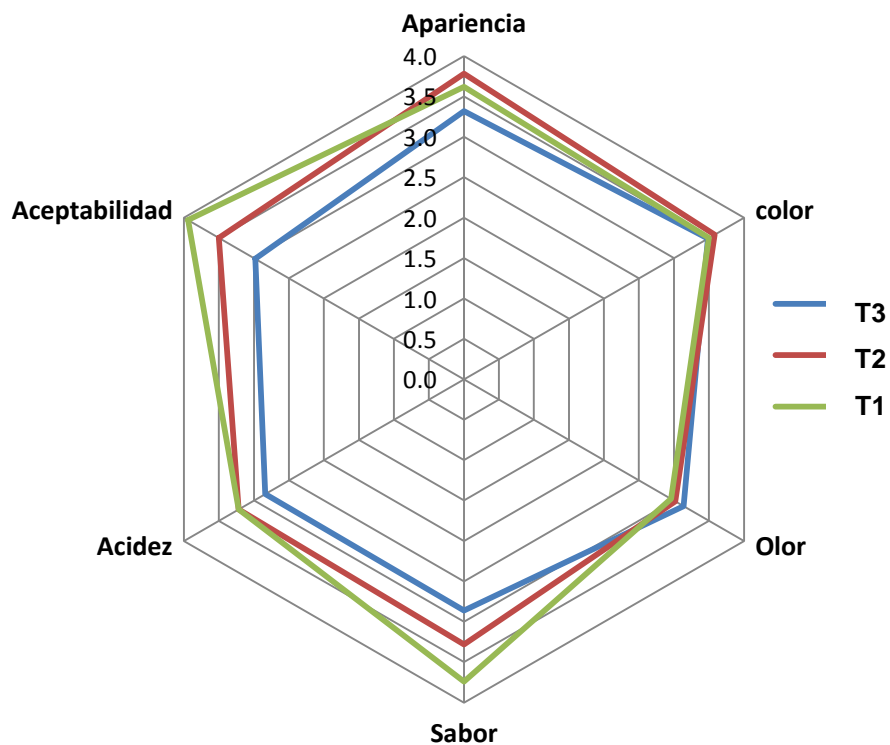
La Tabla 18 y la Figura 15 se obtiene a partir del análisis estadístico (anexos 8-13) de los datos levantados y tabulados en el anexo 7, que corresponde a las pruebas sensoriales realizadas, la metodología de los mismos esta explicada en el numeral 3.12 de este trabajo. Por lo tanto se obtuvieron las siguientes calificaciones en el Análisis Sensorial por atributos del vinagre del cacao.

**Tabla 18.** Análisis Sensorial por Atributos del Vinagre de Cacao.

ATRIBUTOS	T1	T2	T3
Apariencia	3.62 ±1.1 <sup>ab</sup>	3.78 ±0.9 <sup>a</sup>	3.32 ±1.0 <sup>b</sup>
Color	3.50 ±1.1 <sup>a</sup>	3.58 ±0.9 <sup>a</sup>	3.48 ±1.0 <sup>a</sup>
Aroma	2.96 ±1.4 <sup>a</sup>	3.02 ±1.1 <sup>a</sup>	3.14 ±1.3 <sup>a</sup>
Sabor	3.74 ±1.0 <sup>a</sup>	3.28 ±1.2 <sup>ab</sup>	2.86 ±1.4 <sup>b</sup>
Acidez	3.22 ±1.2 <sup>a</sup>	3.22 ±1.2 <sup>a</sup>	2.84 ±1.3 <sup>a</sup>
Aceptabilidad general	3.94 ±0.9 <sup>a</sup>	3.5 ±1.2 <sup>a</sup>	2.98 ±1.4 <sup>b</sup>

$\bar{x} \pm \sigma$  (n=60)

\*Letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas (p<0.05).



**Figura 15.** Análisis Sensorial por promedios de los Atributos del Vinagre del Vino del Cacao.

#### 4.12.1. APARIENCIA

Como se observa en la Tabla 18, existen diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos T2 y T3.

#### 4.12.2. COLOR

En cuanto al color, los datos muestran que no existen diferencias estadísticamente significativas conforme a los tres tratamientos.

#### **4.12.3. AROMA**

Como se muestran los datos obtenidos no existen diferencias significativas relacionadas a la aceptabilidad del aroma del vinagre.

#### **4.12.4. SABOR**

Al analizar la aceptabilidad del sabor del vinagre, se puede observar que las muestras T1 y T3 presentan diferencias significativas en este parámetro evaluado, resultando T1 (3.74/5) la más aceptada en cuanto al sabor.

#### **4.12.5. ACIDEZ**

En cuanto a la acidez de las tres muestras, no se presenta ninguna diferencia estadísticamente significativa.

#### **4.12.6. ACEPTABILIDAD GENERAL**

La evaluación sensorial de la aceptabilidad general del vinagre del mucílago del cacao de acuerdo a los tres diferentes tratamientos, permite concluir que el T1 es el mejor puntuado (3.94/5) y si bien no difiere estadísticamente del T2 si lo hace del T3.

## 5. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

### 5.1. CONCLUSIONES

La fermentación alcohólica dada al mucílago de cacao, permitió obtener un sustrato inicial adecuado para la acetificación del mismo.

Es posible la fermentación acética del exudado del mucílago de cacao in situ, esto se entiende como el lugar de procesamiento de la almendra fresca, ya que rango óptimo de temperatura del proceso 28-32 °C es similar al utilizado en el lugar de cultivo del árbol, por lo que una futura implementación de la investigación es viable.

Las variables del proceso utilizadas en la investigación son; velocidad de agitación 400 rpm, volumen de oxigenación del medio 0.5 vvm constante y temperatura óptima 28-32 °C.

La caracterización físico-química del proceso, permitió concluir que existió una oxidación del etanol presente en el medio por parte de las bacterias del género *acetobacter* debido al agotamiento del alcohol y a la producción de ácido acético en los 3 tratamientos, siendo el óptimo obtenido el T1 (exposición continua al oxígeno) ya que produjo 3.5 g/L. de ácido acético, respecto a la producción de T2 3.34 g/L. y T3 2.69 g/L. medida en el lugar en la cual se llevó a cabo la fermentación durante todo el proceso.

Los resultados del análisis sensorial dada al vinagre final obtenido bajo los 3 tratamientos, indican que el T1 puntuado con 3.94/5 en cuanto a la aceptabilidad global, fue el más aceptado por parte de los panelistas como lo muestra la Figura 15 del presente trabajo.

## 5.2. RECOMENDACIONES

Se debería disminuir el tamaño de las partículas de oxígeno para ampliar la superficie de contacto con las bacterias del género *acetobacter* y así tener un mejor rendimiento en la fermentación.

Al estar la fermentación acética influenciada por variables como; temperatura de fermentación, disolución de partículas y volumen de oxígeno en el medio y velocidad de agitación, se debe automatizar el control de los mismos para una posterior investigación, para un adecuado control y obtener un mejor rendimiento en el mismo

Se puede mejorar las cinéticas de fermentación en el acetificador piloto planteado, aislando y utilizando modelos de cinética de crecimiento para una cepa específica de *acetobacter* en un posterior trabajo tomando como base esta investigación.

Se podría estudiar la oxigenación y el volumen de oxígeno por volumen del medio por minuto para la adecuación y crecimiento de diferentes cepas de *acetobacter*, ya que el desarrollo de las mismas está relacionado con el tamaño de las partículas de oxígeno presente en el medio, lo que provoca una mayor superficie de contacto por parte de estas y una mejor reproducción.

## BIBLIOGRAFIA

- Biotrade. (2010). Diagnóstico del Cacao Sabor Arriba, Programa Nacional de Biocomercio Sostenible – Ecuador. Recuperado el 6 de Enero del 2012, [http://www.biotrade.org/ResourcesNewsAssess/Diagnostico\\_Cacao\\_Arriba\\_Ecuador.pdf](http://www.biotrade.org/ResourcesNewsAssess/Diagnostico_Cacao_Arriba_Ecuador.pdf)
- Burbano, M. (2011). *Ecuador de exportador del mejor cacao del mundo a exportador del mejor chocolate del mundo*. Tesis de grado, Facultad Latinoamericana de Ciencias Sociales, Quito, Ecuador.
- Castro M., Natera Marín R., García M. & García F. (2002). Optimization of headspace solid-phase micro extraction analysis of aroma compounds in vinegar. *J. of Chromatography*.
- Chiriboga, M., Piccioni, R. (1982). *La Producción Campesina Cacaotera: Problemas y Perspectivas*. Quito, Ecuador: CAAP / CECCA.
- Cho, M., Wang, S. (1990) Practical Method for Estimating Oxygen Kinetic and Metabolic Parameters Biotechnology. *Progress. American Institute of Chemical Engineers*. Vol. 6. Recuperado el 24 de Noviembre del 2011 de, <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1021/bp00002a012/abstract>
- Cinta M., Álvarez S. & Zaragoza J. (1998). *Química industrial orgánica*. Valencia, España.: UPV
- De la Torre, L., Navarrete, H., Muriel M., P., Macia, M. & Balslev, H. (2008). *Enciclopedia de las Plantas Útiles del Ecuador*. Quito & Aarhus: Hermario QCA de la Escuela de Ciencias Biológicas de la Pontificia Universidad Católica del Ecuador & Herbario AAU del Departamento de Ciencias Biológicas de la Universidad de Aarhus.

- De Ley J., Gillis M. & Swings J. (1984). *Bergey's Manual of systematic Bacteriology*. Vol. 1, Family VI Acetobacteraceae. Edición: Krieg N. R. y Holt J. C. Williams & Willkins, Baltimore, E.U.A.
- El Universo. (Martes 19 de julio del 2005). Economía: Cacao CCN-51 se reconoce como de alta productividad. Recuperado el 23 de noviembre de 2011. <http://www.eluniverso.com/2005/07/19/0001/9/2D498EAC6A2C48F5B794AFA40F1F83E0.html>
- Enríquez, G., Paredes, A., (1989). *El cultivo del cacao* (3ª reimpresión de la 2ª ed.). San José, Costa Rica: EUNED, Universidad Estatal a Distancia.
- FAO. (Abril, 2010). G36 *Theobroma cacao* L. Recuperado el (9 de noviembre del 2010), de <http://www.fao.org/AG/aga/AGAP/FRG/afris/es/Data/521.HTM>. Federación Nacional de Cafeteros de Colombia. *Cacao. El Cultivo del Cacao*, 1, 3, 22-27.
- Franco, M., Ramírez, M., García, R., Bernal, M., Espinosa, B., Solís, J., Duran, C., (2010). *Revista Latinoamericana el Ambiente y las Ciencias* (1 (2):45-66). Puebla, México. Recuperado el 13 de Marzo del 2013 de, [http://www.buap.mx/portal\\_pprd/work/sites/redica/resources/LocalContent/98/2/REAPROVECHAMIENTO%20INTEGRAL%20%20Francisco-Castillo.pdf](http://www.buap.mx/portal_pprd/work/sites/redica/resources/LocalContent/98/2/REAPROVECHAMIENTO%20INTEGRAL%20%20Francisco-Castillo.pdf)
- García, J. (2008). *Maridaje, enología y cata de vinos*. Antequera, Málaga: Innovación y Cualificación Ediciones, S.L.
- Gepts, P. (2002) (UC Davis department of Plant Sciencs) Recuperado el 18 de abril de 2011, de *The Crop of the Day*. Cacao, *Theobroma cacao*. The Divine Food: <http://www.plantsciences.ucdavis.edu/gepts/pb143/crop/cacao/cacao.htm>
- Gómez, M., Romero, L., Caro, I. & Cantero, D. (1994) *Información Tecnológica* (Vol. 5, N° 6). Cádiz, España. Centro de Información



Tecnológica. La Serena, Chile. Recuperado el 10 de Noviembre del 2011 de, <http://books.google.com.ec/books?id=okLE-BgfYeYC&pg=PA57&lpg=PA57&dq=crecimiento+acetobacter+fermentacion+sumergida&source=bl&ots=GHZBmVEZ8n&sig=acJkeg-pRTkx8X1pHnPiYDqNfp8&hl=en&sa=X&ei=QHKHULb4CJGk8gTm5oDAAw#v=onepage&q&f=false>.

Herman G., Reinhold M. & Gil M. (2008). *Procesos de Cocina*. Madrid, España. Ed. Española, Akal ciclos formativos.

Hernandez, A., (2003) *Microbiología industrial*. San José, Costa Rica: Euned INEN 2296. Vinagre. Requisitos. Segunda revisión. 2003-12.

Kalvatchev, Z., Garzaro, D. & Guerra, F. (1998). *THEOBROMA CACAO L.*: Un nuevo enfoque para nutrición y salud. p. 24

Llaguno C., Polo C. (1991). *El vinagre de vino*. Consejo Superior de Investigaciones Científicas. Madrid, España.

Memorias del primer congreso venezolano del cacao y su industria. (02/2000). Maracay, Venezuela. Fundaacitte Aragua. Recuperado el 15 de agosto del 2012, de <http://es.scribd.com/doc/86984357/Memorias-1er-Congreso-Vzlno-de-Cacao-Fundacite-Aragua>.

Parés, R., Juárez, A. (2002). *Bioquímica de los microorganismos*. Barcelona España.: Reverté S.A.

Peña, P., (25 de Septiembre de 2003). *Chocolate – Origen e historia*. P. Peña, Productor, & RevistaCiencias.com. Recuperado el 21 de Diciembre de 2011, de Revista Ciencias – Publicaciones Científicas: <http://www.revistaciencias.com/publicaciones/EpyuVFuEVAAdDjzYqXB.php>

- Pizarro, O. (2005). Obtención de condiciones de elaboración de vinagre de arándanos (*Vaccinium corymbosum*) utilizando torta de prensa. Tesis de grado, Universidad Austral de Chile, Valdivia, Chile.
- Raymond, E., Donald F., (1966) Enciclopedia de la Tecnología Química. México, D.F.: Uteha.
- Suarez, J. Iñigo B., (2003). Microbiología Enológica. Fundamentos de Vinificación (3ª ed.). Madrid, España: Artes Gráficas Cuesta.
- Vegas P., (2011). Aplicación de métodos moleculares para el estudio de las bacterias acéticas implicadas en la elaboración de vinagre de vino tradicional. Tarragona España.: Universidad Rovira y Virgili. Recuperado el 28 de Agosto del 2012 de <http://www.tdx.cat/bitstream/handle/10803/32784/TESE.pdf;jsessionid=25276BA43F8F6E2ABFC3E49A32968ADD.tdx2?sequence=1>.

# **ANEXO 1. Fotografías del proceso de elaboración de vinagre del exudado del mucílago de cacao.**

## **Extracción del mucílago del cacao a través del prensado**



## **Materiales y equipos utilizados**



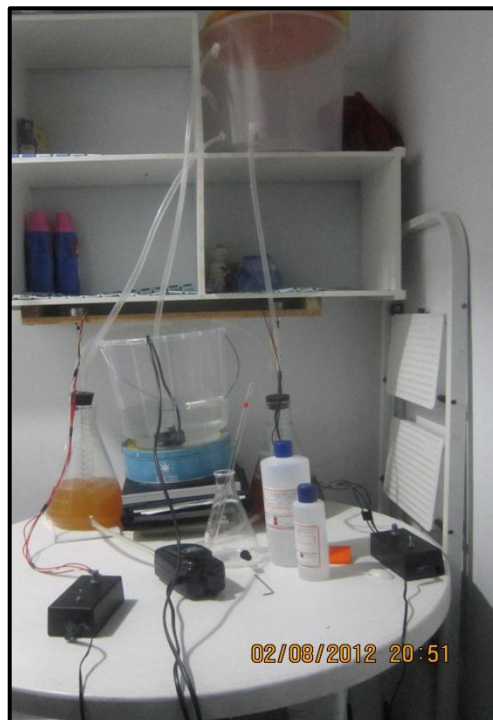
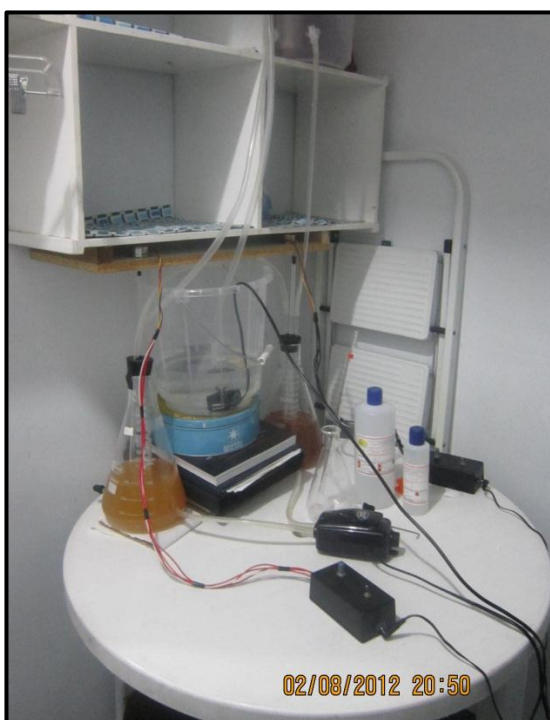
## Fermentación alcohólica del mucílago del cacao



## Vino del mucílago de cacao



## Fermentación ácido acética



## Vinagre utilizado para el análisis sensorial





## Análisis sensorial del vinagre obtenido



**ANEXO 2. Tabla de Contingencia de Datos Obtenidos en la Elaboración de Vinagre del Vino del Mucílago de Cacao**

Tratamiento	Día	Replica	Acidez total (g/l)	Promedio	Acidez producida (Ac. Total - Ac Inicial)	Promedio	Alcohol consumido probable	Promedio	Grado alcohólico probable (relación 1:1)	Promedio	Acidez probable (relación 1:1)	Promedio
1	1	1	1.68	1.68	0.04	0.04	0.04	0.04	7.06	7.06	0.04	0.04
1	1	2	1.69		0.05		0.05		7.05		0.05	
1	2	1	1.83	1.81	0.19	0.17	0.19	0.17	6.91	6.93	0.19	0.17
1	2	2	1.79		0.15		0.15		6.95		0.15	
1	3	1	2.13	2.07	0.49	0.43	0.49	0.43	6.61	6.67	0.49	0.43
1	3	2	2.01		0.37		0.37		6.73		0.37	
1	4	1	2.49	2.36	0.85	0.72	0.85	0.72	6.25	6.38	0.85	0.72
1	4	2	2.23		0.59		0.59		6.51		0.59	
1	5	1	2.91	2.73	1.27	1.09	1.27	1.09	5.83	6.01	1.27	1.09
1	5	2	2.55		0.91		0.91		6.19		0.91	
1	6	1	3.34	3.12	1.70	1.48	1.70	1.48	5.40	5.62	1.70	1.48
1	6	2	2.91		1.27		1.27		5.83		1.27	
1	7	1	3.71	3.49	2.07	1.85	2.07	1.85	5.03	5.25	2.07	1.85
1	7	2	3.28		1.64		1.64		5.46		1.64	
1	8	1	4.03	3.85	2.39	2.21	2.39	2.21	4.71	4.89	2.39	2.21
1	8	2	3.67		2.03		2.03		5.07		2.03	
1	9	1	4.36	4.27	2.72	2.63	2.72	2.63	4.38	4.47	2.72	2.63
1	9	2	4.17		2.53		2.53		4.57		2.53	
1	10	1	4.65	4.64	3.01	3.00	3.01	3.00	4.09	4.10	3.01	3.00
1	10	2	4.62		2.98		2.98		4.12		2.98	
1	11	1	4.85	4.86	3.21	3.22	3.21	3.22	3.89	3.88	3.21	3.22
1	11	2	4.87		3.23		3.23		3.87		3.23	
1	12	1	5.01	5.02	3.37	3.38	3.37	3.38	3.73	3.73	3.37	3.38
1	12	2	5.02		3.38		3.38		3.72		3.38	
1	13	1	5.11	5.10	3.47	3.46	3.47	3.46	3.63	3.64	3.47	3.46
1	13	2	5.09		3.45		3.45		3.65		3.45	
1	14	1	5.14	5.14	3.50	3.50	3.50	3.50	3.60	3.60	3.50	3.50
1	14	2	5.13		3.49		3.49		3.61		3.49	
2	1	1	1.77	1.78	0.03	0.04	0.03	0.04	7.07	7.07	0.03	0.04
2	1	2	1.78		0.04		0.04		7.06		0.04	
2	2	1	1.87	1.87	0.13	0.13	0.13	0.13	6.97	6.97	0.13	0.13
2	2	2	1.86		0.12		0.12		6.98		0.12	
2	3	1	2.11	2.11	0.37	0.37	0.37	0.37	6.73	6.74	0.37	0.37
2	3	2	2.10		0.36		0.36		6.74		0.36	
2	4	1	2.40	2.40	0.66	0.66	0.66	0.66	6.44	6.44	0.66	0.66
2	4	2	2.41		0.67		0.67		6.43		0.67	
2	5	1	2.73	2.73	0.99	0.99	0.99	0.99	6.11	6.11	0.99	0.99
2	5	2	2.73		0.99		0.99		6.11		0.99	
2	6	1	3.07	3.09	1.33	1.35	1.33	1.35	5.77	5.75	1.33	1.35
2	6	2	3.11		1.37		1.37		5.73		1.37	
2	7	1	3.54	3.55	1.80	1.81	1.80	1.81	5.30	5.29	1.80	1.81
2	7	2	3.56		1.82		1.82		5.28		1.82	

...continuación

2	8	1	3.97	3.97	2.23	2.23	2.23	2.23	4.87	4.87	2.23	2.23
2	8	2	3.97		2.23		2.23		4.87		2.23	
2	9	1	4.30	4.30	2.56	2.56	2.56	2.56	4.54	4.54	2.56	2.56
2	9	2	4.31		2.57		2.57		4.53		2.57	
2	10	1	4.56	4.56	2.82	2.82	2.82	2.82	4.28	4.28	2.82	2.82
2	10	2	4.57		2.83		2.83		4.27		2.83	
2	11	1	4.78	4.78	3.04	3.04	3.04	3.04	4.06	4.06	3.04	3.04
2	11	2	4.78		3.04		3.04		4.06		3.04	
2	12	1	4.92	4.93	3.18	3.19	3.18	3.19	3.92	3.91	3.18	3.19
2	12	2	4.94		3.20		3.20		3.90		3.20	
2	13	1	5.05	5.06	3.31	3.32	3.31	3.32	3.79	3.78	3.31	3.32
2	13	2	5.07		3.33		3.33		3.77		3.33	
2	14	1	5.06	5.08	3.32	3.34	3.32	3.34	3.78	3.77	3.32	3.34
2	14	2	5.09		3.35		3.35		3.75		3.35	
3	1	1	1.93	1.92	0.05	0.04	0.05	0.04	7.05	7.06	0.05	0.04
3	1	2	1.91		0.03		0.03		7.07		0.03	
3	2	1	2.02	2.04	0.14	0.16	0.14	0.16	6.96	6.94	0.14	0.16
3	2	2	2.06		0.18		0.18		6.92		0.18	
3	3	1	2.16	2.23	0.28	0.35	0.28	0.35	6.82	6.76	0.28	0.35
3	3	2	2.29		0.41		0.41		6.69		0.41	
3	4	1	2.33	2.47	0.45	0.59	0.45	0.59	6.65	6.52	0.45	0.59
3	4	2	2.60		0.72		0.72		6.38		0.72	
3	5	1	2.56	2.72	0.68	0.84	0.68	0.84	6.42	6.26	0.68	0.84
3	5	2	2.89		1.01		1.01		6.09		1.01	
3	6	1	2.81	3.07	0.93	1.19	0.93	1.19	6.17	5.92	0.93	1.19
3	6	2	3.32		1.44		1.44		5.66		1.44	
3	7	1	3.10	3.37	1.22	1.49	1.22	1.49	5.88	5.61	1.22	1.49
3	7	2	3.64		1.76		1.76		5.34		1.76	
3	8	1	3.43	3.65	1.55	1.77	1.55	1.77	5.55	5.33	1.55	1.77
3	8	2	3.87		1.99		1.99		5.11		1.99	
3	9	1	3.78	3.89	1.90	2.01	1.90	2.01	5.20	5.09	1.90	2.01
3	9	2	4.01		2.13		2.13		4.97		2.13	
3	10	1	4.01	4.07	2.13	2.19	2.13	2.19	4.97	4.91	2.13	2.19
3	10	2	4.12		2.24		2.24		4.86		2.24	
3	11	1	4.23	4.26	2.35	2.38	2.35	2.38	4.75	4.72	2.35	2.38
3	11	2	4.29		2.41		2.41		4.69		2.41	
3	12	1	4.35	4.38	2.47	2.50	2.47	2.50	4.63	4.60	2.47	2.50
3	12	2	4.42		2.54		2.54		4.56		2.54	
3	13	1	4.42	4.47	2.54	2.59	2.54	2.59	4.56	4.51	2.54	2.59
3	13	2	4.52		2.64		2.64		4.46		2.64	
3	14	1	4.53	4.57	2.65	2.69	2.65	2.69	4.45	4.42	2.65	2.69
3	14	2	4.60		2.72		2.72		4.38		2.72	



**ANEXO 3. Datos Promedio de la Gradiente de Acidez  
Producida y °GL Probables Consumidos.**

Tratamiento	Día	Réplica	Alcohol consumido	Gradiente	Promedio	Desviación Estándar	Acidez producida (g/l)	Gradiente	Promedio	Desviación Estándar
1	1	1	0.04	0.3648	0.3821	1.26930	0.04	0.378	0.35775	1.269302
1	2	1	0.19				0.19			
1	3	1	0.49				0.49			
1	4	1	0.85				0.85			
1	5	1	1.27				1.27			
1	6	1	1.70				1.70			
1	7	1	2.07				2.07			
1	8	1	2.39				2.39			
1	9	1	2.72				2.72			
1	10	1	3.01				3.01			
1	11	1	3.21				3.21			
1	12	1	3.37				3.37			
1	13	1	3.47				3.47			
1	14	1	3.50				3.50			
1	1	2	0.05	0.3994	0.3821	1.26930	0.05	0.3375	0.35775	1.269302
1	2	2	0.15				0.15			
1	3	2	0.37				0.37			
1	4	2	0.59				0.59			
1	5	2	0.91				0.91			
1	6	2	1.27				1.27			
1	7	2	1.64				1.64			
1	8	2	2.03				2.03			
1	9	2	2.53				2.53			
1	10	2	2.98				2.98			
1	11	2	3.23				3.23			
1	12	2	3.38				3.38			
1	13	2	3.45				3.45			
1	14	2	3.49				3.49			

...continuación

2	1	1	0.03	0.3577	0.36795	1.218699	0.03	0.3917	0.38495	1.218699
2	2	1	0.13				0.13			
2	3	1	0.37				0.37			
2	4	1	0.66				0.66			
2	5	1	0.99				0.99			
2	6	1	1.33				1.33			
2	7	1	1.80				1.80			
2	8	1	2.23				2.23			
2	9	1	2.56				2.56			
2	10	1	2.82				2.82			
2	11	1	3.04				3.04			
2	12	1	3.18				3.18			
2	13	1	3.31				3.31			
2	14	1	3.32				3.32			
2	1	2	0.04	0.3782	0.36795	1.218699	0.04	0.3782	0.38495	1.218699
2	2	2	0.12				0.12			
2	3	2	0.36				0.36			
2	4	2	0.67				0.67			
2	5	2	0.99				0.99			
2	6	2	1.37				1.37			
2	7	2	1.82				1.82			
2	8	2	2.23				2.23			
2	9	2	2.57				2.57			
2	10	2	2.83				2.83			
2	11	2	3.04				3.04			
2	12	2	3.20				3.20			
2	13	2	3.33				3.33			
2	14	2	3.35				3.35			
3	1	1	0.05	0.3267	0.31635	0.014637	0.05	0.2748	0.3078	0.945391
3	2	1	0.14				0.14			
3	3	1	0.28				0.28			
3	4	1	0.45				0.45			
3	5	1	0.68				0.68			
3	6	1	0.93				0.93			
3	7	1	1.22				1.22			
3	8	1	1.55				1.55			
3	9	1	1.90				1.90			
3	10	1	2.13				2.13			
3	11	1	2.35				2.35			
3	12	1	2.47				2.47			
3	13	1	2.54				2.54			
3	14	1	2.65				2.65			
3	1	2	0.03	0.306	0.31635	0.014637	0.03	0.3408	0.3078	0.945391
3	2	2	0.18				0.18			
3	3	2	0.41				0.41			
3	4	2	0.72				0.72			
3	5	2	1.01				1.01			
3	6	2	1.44				1.44			
3	7	2	1.76				1.76			
3	8	2	1.99				1.99			
3	9	2	2.13				2.13			
3	10	2	2.24				2.24			
3	11	2	2.41				2.41			
3	12	2	2.54				2.54			
3	13	2	2.64				2.64			
3	14	2	2.72				2.72			

## ANEXO 4. Análisis de Varianza para Gradiente °GL Consumidos/Día según tratamiento

### Análisis de la Varianza para Gradiente °GL - Sumas de Cuadrados de Tipo III

Fuente	Suma de cuadrados	GL	Cuadrado Medio	Cociente-F	P-Valor
<b>Efectos Principales</b>					
<b>A: Tratamientos</b>	0.00479056	3	1.82442	7.02	0.0738
<b>B: Réplicas</b>	0.00102295	2	0.000340983		
<b>TOTAL (Corregido)</b>	0.00581351	5			

Los cocientes F están basados en el error cuadrático medio residual.

### Contraste Múltiple de Rangos para Gradiente °GL según Tratamientos

Método: 95.0		Porcentaje		
LSD				
Tratamientos	Recuento	Media LS	Sigma LS	Grupos Homogéneos
1	2	-0.3721	0.0587663	X*
2	2	-0.3754	0.0587663	XX
3	2	-0.3021	0.0587663	X*

\* indica una diferencia significativa.

## ANEXO 5. Análisis de Varianza para Gradiente Acidez Producida/Día

### Análisis de la Varianza para Gradiente °GL - Sumas de Cuadrados de Tipo III

Fuente	Suma de cuadrados	GL	Cuadrado Medio	Cociente-F	P-Valor
<b>Efectos Principales</b>					
<b>A: Tratamientos</b>	0.00612464	3	0.00306232	2.97	0.1941
<b>B: Réplicas</b>	0.00308925	2	0.00102975		
<b>TOTAL (Corregido)</b>	0.00921389	5			

El cociente F está basado en el error cuadrático medio residual.

### Contraste Múltiple de Rangos para Gradiente °GL según Tratamientos

Método: 95.0		Porcentaje		
LSD				
Tratamientos	Recuento	Media LS	Sigma LS	Grupos Homogéneos
<b>3</b>	2	0.2753	0.102124	X*
<b>1</b>	2	0.3694	0.102124	X
<b>2</b>	2	0.3771	0.102124	X

\* indica una diferencia significativa.

## ANEXO 6. Ficha de Análisis Sensorial

Nombre:  
Edad:  
Teléfono:  
Sexo:

En la escala del 1 al 5, califique para las muestras A, B y C como indica la siguiente tabla:

- 1 “Me disgusta mucho”
- 2 “Me disgusta poco”
- 3 “Ni me gusta ni me disgusta”
- 4 “Me gusta poco”
- 5 “Me gusta mucho”

1.- ¿Es usted consumidor habitual de vinagre?

Si ( ) No ( )

Si su respuesta es afirmativa pase a la pregunta 2, si no devuelva la encuesta.

Por favor tome una a una y en orden A, B y C los vasos con la muestra del vinagre y puntúe en la escala del 1 al 5 los siguientes parámetros.

**2- Califique la APARIENCIA GENERAL del vinagre, analice visualmente.**

PARAMETRO	MUESTRA	A	B	C
<b>Apariencia Gral.</b>	1 Me disgusta mucho			
	2 Me disgusta poco			
	3 Ni me gusta ni me disgusta			
	4 Me gusta poco			
	5 Me gusta mucho			

**3- Califique el COLOR del vinagre**

PARAMETRO	MUESTRA	A	B	C
<b>Color</b>	1 Me disgusta mucho			
	2 Me disgusta poco			
	3 Ni me gusta ni me			

	disgusta			
	4 Me gusta poco			
	5 Me gusta mucho			

**4.- Califique el AROMA del vinagre**

PARAMETRO	MUESTRA	A	B	C
<b>Aroma</b>	1 Me disgusta mucho			
	2 Me disgusta poco			
	3 Ni me gusta ni me disgusta			
	4 Me gusta poco			
	5 Me gusta mucho			

**5.- Califique el SABOR del vinagre, analícelo.**

PARAMETRO	MUESTRA	A	B	C
<b>Sabor</b>	1 Me disgusta mucho			
	2 Me disgusta poco			
	3 Ni me gusta ni me disgusta			
	4 Me gusta poco			
	5 Me gusta mucho			

**6.- Analice y califique la ACIDEZ del vinagre, esto puede hacerlo pasando el líquido por la zona posterior de la lengua (laterales).**

PARAMETRO	MUESTRA	A	B	C
<b>Acidez</b>	1 Me disgusta mucho			
	2 Me disgusta poco			
	3 Ni me gusta ni me disgusta			

	4 Me gusta poco			
	5 Me gusta mucho			

**7.- Tome las muestras y sívala en las diferentes lechugas que tiene en los platos, ingiérala y pondere la aceptabilidad general del vinagre utilizado como aderezo.**

<b>PARAMETRO</b>	<b>MUESTRA</b>	<b>A</b>	<b>B</b>	<b>C</b>
<b>Aceptabilidad Gral.</b>	1 Me disgusta mucho			
	2 Me disgusta poco			
	3 Ni me gusta ni me disgusta			
	4 Me gusta poco			
	5 Me gusta mucho			

## ANEXO 7. Calificación sensorial del vinagre por atributos.

Muestra	Panelista	Apariencia	Promedio	Desviación Estándar	Color	Promedio	Desviación Estándar	Olor	Promedio	Desviación Estándar
A	1	4	3.3	1.0	4	3.5	1.0	3	3.1	1.3
A	2	4			3					
A	3	3			3					
A	4	5			5					
A	5	4			4					
A	6	4			5					
A	7	4			3					
A	8	3			2					
A	9	2			3					
A	10	2			4					
A	11	3			3					
A	12	2			3					
A	13	5			5					
A	14	3			2					
A	15	4			4					
A	16	5			5					
A	17	2			2					
A	18	3			2					
A	19	3			4					
A	20	2			4					
A	21	3			4					
A	22	5			3					
A	23	2			3					
A	24	4			5					
A	25	4			4					
A	26	3			5					
A	27	5			3					
A	28	2			2					
A	29	2			3					
A	30	2			4					
A	31	4			3					
A	32	3			3					
A	33	4			5					
A	34	5			2					
A	35	4			4					
A	36	2			5					
A	37	3			2					
A	38	4			2					
A	39	4			4					
A	40	3			4					
A	41	4			3					
A	42	2			3					
A	43	2			3					
A	44	4			4					
A	45	3			5					
A	46	4			2					
A	47	2			3					
A	48	3			4					
A	49	4			4					
A	50	3			3					
A	51	3			4					
A	52	3			3					
A	53	4			5					
A	54	5			4					
A	55	3			3					
A	56	2			4					
A	57	5			2					
A	58	3			1					
A	59	2			5					
A	60	3			4					



...continuación

Muestra	Panelista	Sabor	Promedio	Desviación Estándar	Acidez	Promedio	Desviación Estándar	Aceptabilidad General.	Promedio	Desviación Estándar
A	1	1	2.9	1.4	1	2.8	1.3	2	3.0	1.4
A	2	4			3					
A	3	2			4					
A	4	4			3					
A	5	2			1					
A	6	1			1					
A	7	4			3					
A	8	1			3					
A	9	2			1					
A	10	3			2					
A	11	3			3					
A	12	5			4					
A	13	5			5					
A	14	4			4					
A	15	4			4					
A	16	5			5					
A	17	2			1					
A	18	1			3					
A	19	2			2					
A	20	4			3					
A	21	3			1					
A	22	1			4					
A	23	4			3					
A	24	2			1					
A	25	2			3					
A	26	3			4					
A	27	2			3					
A	28	1			1					
A	29	1			1					
A	30	4			3					
A	31	2			3					
A	32	4			1					
A	33	2			2					
A	34	1			3					
A	35	4			4					
A	36	1			5					
A	37	2			4					
A	38	3			4					
A	39	3			5					
A	40	5			1					
A	41	5			3					
A	42	4			2					
A	43	4			3					
A	44	5			2					
A	45	2			3					
A	46	1			4					
A	47	2			2					
A	48	4			4					
A	49	4			3					
A	50	3			4					
A	51	4			2					
A	52	3			1					
A	53	5			3					
A	54	2			3					
A	55	2			2					
A	56	4			5					
A	57	1			4					
A	58	5			3					
A	59	3			5					
A	60	2			4					

...continuación

B	1	4			3			4		
B	2	5			3			3		
B	3	3			4			3		
B	4	5			5			4		
B	5	4			4			4		
B	6	4			5			1		
B	7	4			3			4		
B	8	5			4			3		
B	9	2			4			2		
B	10	3			4			3		
B	11	3			3			4		
B	12	2			2			3		
B	13	4			3			2		
B	14	4			2			4		
B	15	2			4			3		
B	16	5			5			5		
B	17	5			5			5		
B	18	4			2			2		
B	19	3			4			3		
B	20	4			3			2		
B	21	5			3			1		
B	22	3			3			4		
B	23	3			4			3		
B	24	4			5			2		
B	25	5			4			2		
B	26	4			5			1		
B	27	3			3			4		
B	28	5			4			3		
B	29	4			4			3		
B	30	4	3.8	0.9	4	3.6	0.9	4	3.0	1.1
B	31	2			3			4		
B	32	4			2			1		
B	33	5			3			4		
B	34	4			2			3		
B	35	3			4			2		
B	36	5			5			3		
B	37	4			5			4		
B	38	3			2			3		
B	39	5			4			2		
B	40	4			3			4		
B	41	3			4			3		
B	42	4			3			5		
B	43	3			5			5		
B	44	4			4			2		
B	45	4			2			3		
B	46	4			3			2		
B	47	4			3			3		
B	48	2			3			2		
B	49	3			4			1		
B	50	4			4			4		
B	51	3			3			1		
B	52	1			5			1		
B	53	2			2			3		
B	54	5			4			5		
B	55	2			3			2		
B	56	3			3			4		
B	57	5			4			3		
B	58	4			5			3		
B	59	4			2			2		
B	60	1			3			3		

...continuación

Muestra	Panelista	Sabor	Promedio	Desviación Estándar	Acidez	Promedio	Desviación Estándar	Aceptabilidad General.	Promedio	Desviación Estándar
B	1	4	3.3	1.2	4	3.2	1.2	4	3.5	1.2
B	2	5			2					
B	3	3			4					
B	4	1			1					
B	5	4			4					
B	6	4			4					
B	7	3			2					
B	8	4			5					
B	9	4			4					
B	10	2			2					
B	11	4			4					
B	12	3			2					
B	13	4			4					
B	14	5			5					
B	15	3			2					
B	16	5			4					
B	17	4			5					
B	18	1			2					
B	19	3			3					
B	20	1			2					
B	21	4			4					
B	22	5			2					
B	23	3			3					
B	24	4			3					
B	25	2			4					
B	26	2			4					
B	27	2			2					
B	28	3			4					
B	29	4			1					
B	30	1			4					
B	31	5			4					
B	32	3			2					
B	33	4			5					
B	34	3			4					
B	35	4			2					
B	36	2			4					
B	37	2			2					
B	38	3			4					
B	39	1			5					
B	40	4			2					
B	41	5			4					
B	42	3			5					
B	43	2			2					
B	44	4			3					
B	45	4			2					
B	46	4			5					
B	47	4			4					
B	48	3			2					
B	49	5			2					
B	50	2			2					
B	51	3			2					
B	52	5			4					
B	53	4			3					
B	54	2			2					
B	55	3			1					
B	56	4			5					
B	57	1			3					
B	58	4			4					
B	59	5			2					
B	60	3			2					

...continuación

C	1	4			4			2		
C	2	4			3			3		
C	3	2			3			2		
C	4	5			5			5		
C	5	4			4			3		
C	6	4			5			1		
C	7	5			4			2		
C	8	3			2			5		
C	9	2			3			4		
C	10	2			4			4		
C	11	4			3			4		
C	12	4			5			1		
C	13	4			3			2		
C	14	5			1			4		
C	15	1			2			4		
C	16	5			5			5		
C	17	5			5			5		
C	18	4			4			1		
C	19	3			4			2		
C	20	3			3			3		
C	21	4			4			1		
C	22	4			3			2		
C	23	2			3			4		
C	24	5			5			3		
C	25	4			4			2		
C	26	4			5			2		
C	27	5			4			3		
C	28	3			2			2		
C	29	2			3			5		
C	30	2	3.6	1.1	4	3.5	1.1	3	3.0	1.4
C	31	4			3			1		
C	32	4			5			2		
C	33	4			3			5		
C	34	5			1			4		
C	35	1			2			4		
C	36	5			5			4		
C	37	5			5			1		
C	38	4			4			2		
C	39	3			4			4		
C	40	3			3			4		
C	41	4			3			5		
C	42	5			3			5		
C	43	2			2			1		
C	44	3			4			2		
C	45	4			5			2		
C	46	3			3			2		
C	47	3			2			4		
C	48	4			2			3		
C	49	2			3			3		
C	50	5			4			1		
C	51	4			4			2		
C	52	2			3			2		
C	53	3			2			1		
C	54	3			3			3		
C	55	3			3			4		
C	56	2			1			5		
C	57	4			1			5		
C	58	5			5			2		
C	59	1			3			3		
C	60	3			2			1		

...continuación

Muestra	Panelista	Sabor	Promedio	Desviación Estándar	Acidez	Promedio	Desviación Estándar	Aceptabilidad General.	Promedio	Desviación Estándar
C	1	2	3.7	1.0	3	3.2	1.2	3	3.9	0.9
C	2	4			1					
C	3	4			5					
C	4	5			5					
C	5	4			4					
C	6	2			2					
C	7	5			3					
C	8	5			4					
C	9	5			5					
C	10	4			2					
C	11	4			5					
C	12	3			3					
C	13	3			2					
C	14	4			4					
C	15	3			2					
C	16	4			3					
C	17	5			5					
C	18	2			3					
C	19	3			2					
C	20	4			3					
C	21	4			4					
C	22	5			5					
C	23	3			2					
C	24	2			2					
C	25	4			2					
C	26	4			3					
C	27	5			1					
C	28	5			5					
C	29	3			5					
C	30	5			4					
C	31	3			2					
C	32	3			3					
C	33	4			4					
C	34	5			5					
C	35	3			2					
C	36	4			5					
C	37	2			3					
C	38	4			2					
C	39	5			4					
C	40	5			2					
C	41	3			3					
C	42	3			5					
C	43	2			3					
C	44	4			2					
C	45	4			3					
C	46	4			1					
C	47	3			4					
C	48	5			3					
C	49	4			3					
C	50	2			3					
C	51	4			4					
C	52	1			4					
C	53	2			5					
C	54	1			2					
C	55	5			3					
C	56	2			1					
C	57	2			4					
C	58	3			3					
C	59	1			1					
C	60	5			2					

## ANEXO 8. Análisis de Varianza para “Apariencia” del Vinagre de Cacao

### Análisis de la Varianza para Apariencia - Sumas de Cuadrados de Tipo III

Fuente	Suma de cuadrados	GL	Cuadrado Medio	Cociente-F	P-Valor
<b>Efectos Principales</b>					
<b>A: Muestra</b>	5.45333	2	2.72667	2.62	0.0765
<b>B: Panelista</b>	153.24	177	1.04245		
<b>TOTAL (Corregido)</b>	158.693	29			

Los cocientes F están basados en el error cuadrático medio residual.

### Contraste Múltiple de Rangos para Apariencia

Método: 95.0		Porcentaje LSD	
Muestra	Recuento	Media LS	Grupos Homogéneos
A	60	3.32	X
C	60	3.62	XX
B	60	3.78	X
Contraste			Diferencias +/- Límites
A - B			*-0.46 0. 403549
A - C			-0.3 0. 403549
B - C			0.16 0. 403549

\* indica una diferencia significativa.

## ANEXO 9. Análisis de Varianza para “Color” del Vinagre de Cacao

### Análisis de la Varianza para Color - Sumas de Cuadrados de Tipo III

Fuente	Suma de cuadrados	GL	Cuadrado Medio	Cociente-F	P-Valor
<b>Efectos Principales</b>					
<b>A: Muestra</b>	0.28	2	0.14	0.13	0.874
<b>B: Panelista</b>	153.16	167	1.0419		
<b>TOTAL (Corregido)</b>	153.44	179			

Los cocientes F están basados en el error cuadrático medio residual.

### Contraste Múltiple de Rangos para Color

Método: 95.0		Porcentaje LSD	
Muestra	Recuento	Media LS	Grupos Homogéneos
A	60	3.48	X
C	60	3.5	X
B	60	3.58	X
Contraste		Diferencias	+/- Límites
A - B		0.1	0.403444
A - C		0.02	0.403444
B - C		0.08	0.403444

\* indica una diferencia significativa.

## ANEXO 10. Análisis de Varianza para “Olor” del Vinagre de Cacao

### Análisis de la Varianza para Olor - Sumas de Cuadrados de Tipo III

Fuente	Suma de cuadrados	GL	Cuadrado Medio	Cociente-F	P-Valor
<b>Efectos Principales</b>					
<b>A: Muestra</b>	0.84	2	0.42	0.27	0.7640
<b>B: Panelista</b>	228.92	177	1.55728		
<b>TOTAL (Corregido)</b>	229.76	179			

Los cocientes F están basados en el error cuadrático medio residual.

### Contraste Múltiple de Rangos para Olor

Método: 95.0		Porcentaje LSD	
Muestra	Recuento	Media LS	Grupos Homogéneos
C	60	2.96	X
B	60	3.02	X
A	60	3.14	X
Contraste		Diferencias	+/- Límites
A - B		0.12	0.493233
A - C		0.18	0.493233
B - C		0.06	0.493233

\* indica una diferencia significativa.



## ANEXO 11. Análisis de Varianza para “Sabor” del Vinagre de Cacao

### Análisis de la Varianza para Sabor - Sumas de Cuadrados de Tipo III

Fuente	Suma de cuadrados	GL	Cuadrado Medio	Cociente-F	P-Valor
<b>Efectos Principales</b>					
<b>A: Muestra</b>	19.3733	2	9.68667	6.79	0.0015
<b>B: Panelista</b>	209.72	147	1.42667		
<b>TOTAL (Corregido)</b>	2229.093	179			

Los cocientes F están basados en el error cuadrático medio residual.

### Contraste Múltiple de Rangos para Sabor

Método: 95.0		Porcentaje LSD	
Muestra	Recuento	Media LS	Grupos Homogéneos
A	60	2.86	X
B	60	3.28	XX
C	60	3.74	X
Contraste			Diferencias +/- Límites
A – B			-0.42 0. 472096
A - C			*-0.88 0. 472096
B – C			-0.46 0. 472096

\* indica una diferencia significativa.

## ANEXO 12. Análisis de Varianza para “Acidez” del Vinagre de Cacao

### Análisis de la Varianza para Acidez - Sumas de Cuadrados de Tipo III

Fuente	Suma de cuadrados	GL	Cuadrado Medio	Cociente-F	P-Valor
<b>Efectos Principales</b>					
<b>A: Muestra</b>	4.81333	2	2.40667	1.59	0.2065
<b>B: Panelista</b>	221.88	177	1.50939		
<b>TOTAL (Corregido)</b>	226.693	179			

Los cocientes F están basados en el error cuadrático medio residual.

### Contraste Múltiple de Rangos para Acidez

Método: 95.0		Porcentaje LSD	
Muestra	Recuento	Media LS	Grupos Homogéneos
A	60	2.84	X
C	60	3.22	X
B	60	3.22	X
Contraste			Diferencias +/- Límites
A - B			-0.38 0.48559
A - C			-0.38 0.48559
B - C			0 0.48559

\* indica una diferencia significativa.

## ANEXO 13. Análisis de Varianza para “Aceptabilidad Global” del Vinagre de Cacao

### Análisis de la Varianza para Aceptabilidad Global - Sumas de Cuadrados de Tipo III

Fuente	Suma de cuadrados	GL	Cuadrado Medio	Cociente-F	P-Valor
<b>Efectos Principales</b>					
<b>A: Muestra</b>	23.0933	2	11.5467	8.47	0.0003
<b>B: Panelista</b>	200.3	177	1.36259		
<b>TOTAL (Corregido)</b>	223.393	179			

Los cocientes F están basados en el error cuadrático medio residual.

### Contraste Múltiple de Rangos para Aceptabilidad Global

Método: 95.0		Porcentaje LSD	
Muestra	Recuento	Media LS	Grupos Homogéneos
A	60	2.98	X
B	60	3.5	X
C	60	3.94	X
Contraste		Diferencias	+/- Límites
A – B		*-0.52	0.461372
A - C		*-0.96	0.461372
B - C		-0.44	0.461372

\* indica una diferencia significativa.

## ANEXO 14. Análisis Físicoquímico del Sustrato.



ANÁLISIS DE ALIMENTOS, AGUAS Y AFINES  
INFORME DE RESULTADOS

Orden de trabajo N° 121191  
Hoja 1 de 1

**NOMBRE:** Sebastián Villagómez  
**DIRECCIÓN:** Jaime Andrade Moscoso N 45-161  
**FECHA DE RECEPCION:** 15 de mayo del 2012  
**MUESTRA:** Vino de frutas  
**DESCRIPCIÓN DE LA MUESTRA:** Líquido turbio color anaranjado  
**ENVASE:** Botella de vidrio  
**FECHA DE TOMA DE MUESTRA:** ----  
**FECHA VENCIMIENTO:** ----  
**LOTE:** ----  
**FECHA DE REALIZACIÓN DE ENSAYO:** 15 - 16 de mayo del 2012  
**REFERENCIA:** 121191  
**MUESTREADO:** Por cliente  
**CONDICIONES AMBIENTALES:** 24 °C 37% HR

### ANÁLISIS QUÍMICO:

PARÁMETRO	MÉTODO	RESULTADO
Grado Alcohólico (°GL)	NTE INEN 360	7.10
Acidez Total (g/1000cm <sup>3</sup> ácido acético)	NTE INEN 341	1.44

  
Dr. Oscar Luzuriaga  
PRESIDENTE

  
ANÁLISIS DE ALIMENTOS, AGUAS Y AFINES

El presente informe es válido para la muestra analizada.

Este informe no debe reproducirse más que en su totalidad previa autorización escrita de LABOLAB.

### INFORME TÉCNICO, FICHA DE ESTABILIDAD, INFORMACIÓN NUTRICIONAL PARA REGISTRO SANITARIO

Análisis físico, químico, microbiológico, entomológico de: alimentos, aguas, bebidas, materias primas, balanceados, cosméticos, pesticidas, suelos, metales pesados y otros.  
Av. Pérez Guerrero Oe 21-11 y Versalles - Of. 12B - 2do. Piso - Telefax.: 2563-225 / 2235-404 / 3214-333 / 3214-353 Cel.: 09 9442-153

[www.labolab.com.ec](http://www.labolab.com.ec)

e-mails: [olg@ecnet.ec](mailto:olg@ecnet.ec) / [driluzuriaga@hotmail.com](mailto:driluzuriaga@hotmail.com) / [servicioalcliente@labolab.com.ec](mailto:servicioalcliente@labolab.com.ec)

Quito - Ecuador

# ANEXO 15. Análisis Físicoquímico del Vinagre "C" (Tratamiento 1).



Orden de trabajo N° 122721  
Hoja 3 de 3

**NOMBRE DEL CLIENTE:** Sebastián Villagómez  
**DIRECCIÓN:** Jaime Andrade Moscoso N 45-161  
**FECHA DE RECEPCION:** 11 de octubre del 2012  
**MUESTRA:** Vinagre C  
**DESCRIPCION DE LA MUESTRA:** Líquido café rojizo  
**FECHA DE ELABORACION:** 18 de septiembre del 2012  
**FECHA DE VENCIMIENTO:** -----  
**LOTE:** -----  
**ENVASE:** Frasco de vidrio  
**FECHA DE REALIZACIÓN DE ENSAYO:** 11 - 15 de octubre del 2012  
**REFERENCIA:** 122723  
**MUESTREADO:** Por el cliente  
**CONDICIONES AMBIENTALES:** 24°C 31% HR

## ANALISIS QUIMICO:

PARÁMETRO	MÉTODO	RESULTADO
Grado Alcohólico (°GL)	NTE INEN 360	0.00
Acidez Total (g/1000cm <sup>3</sup> ácido acético)	NTE INEN 341	4.05
Acidez Fija (g/1000 cm <sup>3</sup> / ácido acético)	NTE INEN 341	0.08
Acidez Volátil (g/1000 cm <sup>3</sup> ácido acético)	NTE INEN 341	3.97
Extracto seco (%)	NTE INEN 346	2.25
Número de oxidación con permanganato	AOAC 944.10	19.10
Aldehídos (mg etanal/ 100 ml alcohol anhidro)	NTE INEN 343	3.41

Dr. Oscar Luzuriaga  
PRESIDENTE

El presente informe es válido sólo para la muestra analizada.  
Este informe no debe reproducirse más que en su totalidad previa autorización escrita de LABOLAB.

## INFORME TÉCNICO, FICHA DE ESTABILIDAD, INFORMACIÓN NUTRICIONAL PARA REGISTRO SANITARIO

Análisis físico, químico, microbiológico, entomológico de: alimentos, aguas, bebidas, materias primas, balanceados, cosméticos, pesticidas, suelos, metales pesados y otros.  
Av. Pérez Guerrero Oe 21-11 y Versalles - Of. 12B - 2do. Piso - Telefax.: 2563-225 / 2235-404 / 3214-333 / 3214-353 Cel.: 09 9442-153

[www.labolab.com.ec](http://www.labolab.com.ec)

e-mails: [olg@ecnet.ec](mailto:olg@ecnet.ec) / [drluzuriaga@hotmail.com](mailto:drluzuriaga@hotmail.com) / [servicioalcliente@labolab.com.ec](mailto:servicioalcliente@labolab.com.ec)

Quito - Ecuador



## ANEXO 16. Análisis Físicoquímico del Vinagre "B" (Tratamiento 2).



Orden de trabajo N° 122721  
Hoja 2 de 3

**NOMBRE DEL CLIENTE:** Sebastián Villagómez  
**DIRECCIÓN:** Jaime Andrade Moscoso N 45-161  
**FECHA DE RECEPCION:** 11 de octubre del 2012  
**MUESTRA:** Vinagre B  
**DESCRIPCION DE LA MUESTRA:** Líquido café rojizo  
**FECHA DE ELABORACION:** 3 de septiembre del 2012  
**FECHA DE VENCIMIENTO:** -----  
**LOTE:** -----  
**ENVASE:** Frasco de vidrio  
**FECHA DE REALIZACIÓN DE ENSAYO:** 11 - 15 de octubre del 2012  
**REFERENCIA:** 122722  
**MUESTREADO:** Por el cliente  
**CONDICIONES AMBIENTALES:** 24°C 31% HR

### ANALISIS QUIMICO:

PARÁMETRO	MÉTODO	RESULTADO
Grado Alcohólico (°GL)	NTE INEN 360	0.00
Acidez Total (g/1000cm <sup>3</sup> ácido acético)	NTE INEN 341	4.00
Acidez Fija (g/1000 cm <sup>3</sup> ácido acético)	NTE INEN 341	0.08
Acidez Volátil (g/1000 cm <sup>3</sup> ácido acético)	NTE INEN 341	3.92
Extracto seco (%)	NTE INEN 346	2.24
Número de oxidación con permanganato	AOAC 944.10	17.75
Aldehídos (mg ctanal/ 100 ml alcohol anhidro)	NTE INEN 343	4.29

Dr. Oscar Luzuriaga  
PRESIDENTE  
LABOLAB  
ANÁLISIS DE ALIMENTOS, AGUAS Y AFINES

El presente informe es válido sólo para la muestra analizada.  
Este informe no debe reproducirse más que en su totalidad previa autorización escrita de LABOLAB.

### INFORME TÉCNICO, FICHA DE ESTABILIDAD, INFORMACIÓN NUTRICIONAL PARA REGISTRO SANITARIO

Análisis físico, químico, microbiológico, entomológico de: alimentos, aguas, bebidas, materias primas, balanceados, cosméticos, pesticidas, suelos, metales pesados y otros.  
Av. Pérez Guerrero Oe 21-11 y Versalles - Of. 12B - 2do. Piso - Telefax.: 2563-225 / 2235-404 / 3214-333 / 3214-353 Cel.: 09 9442-153

[www.labolab.com.ec](http://www.labolab.com.ec)

e-mails: [olg@ecnet.ec](mailto:olg@ecnet.ec) / [drluzuriaga@hotmail.com](mailto:drluzuriaga@hotmail.com) / [serviciocliente@labolab.com.ec](mailto:serviciocliente@labolab.com.ec)

Quito - Ecuador

## ANEXO 17. Análisis Físicoquímico del Vinagre "A" (Tratamiento 3).

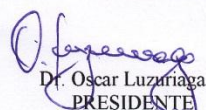
### LABOLAB ANÁLISIS DE ALIMENTOS, AGUAS Y AFINES INFORME DE RESULTADOS

Orden de trabajo N° 122721  
Hoja 1 de 3

**NOMBRE DEL CLIENTE:** Sebastián Villagóntez  
**DIRECCIÓN:** Jaime Andrade Moscoso N 45-161  
**FECHA DE RECEPCION:** 11 de octubre del 2012  
**MUESTRA:** Vinagre A  
**DESCRIPCION DE LA MUESTRA:** Líquido café rojizo  
**FECHA DE ELABORACION:** 20 de agosto del 2012  
**FECHA DE VENCIMIENTO:** -----  
**LOTE:** -----  
**ENVASE:** Frasco de vidrio  
**FECHA DE REALIZACIÓN DE ENSAYO:** 11 - 15 de octubre del 2012  
**REFERENCIA:** 122721  
**MUESTREADO:** Por el cliente  
**CONDICIONES AMBIENTALES:** 24°C 31% HR

#### ANÁLISIS QUÍMICO:

PARÁMETRO	MÉTODO	RESULTADO
Grado Alcohólico (°GL)	NTE INEN 360	0.00
Acidez Total (g/1000cm <sup>3</sup> ácido acético)	NTE INEN 341	4.00
Acidez Fija (g/1000 cm <sup>3</sup> / ácido acético)	NTE INEN 341	0.08
Acidez Volátil (g/1000 cm <sup>3</sup> ácido acético)	NTE INEN 341	3.92
Extracto seco (%)	NTE INEN 346	2.32
Número de oxidación con permanganato	AOAC 944.10	15.50
Aldehídos (mg etanal/ 100 ml alcohol anhidro)	NTE INEN 343	3.08

  
Dr. Oscar Luzuriaga  
PRESIDENTE

El presente informe es válido sólo para la muestra analizada.

Este informe no debe reproducirse más que en su totalidad previa autorización escrita de LABOLAB.

**LABOLAB**  
ANÁLISIS DE ALIMENTOS, AGUAS Y AFINES

#### INFORME TÉCNICO, FICHA DE ESTABILIDAD, INFORMACIÓN NUTRICIONAL PARA REGISTRO SANITARIO

Análisis físico, químico, microbiológico, entomológico de: alimentos, aguas, bebidas, materias primas, balanceados, cosméticos, pesticidas, suelos, metales pesados y otros.

Av. Pérez Guerrero Oe 21-11 y Versalles - Of. 12B - 2do. Piso - Telefax.: 2563-225 / 2235-404 / 3214-333 / 3214-353 Cel.: 09 9442-153

e-mails: olg@ecnet.ec / drluzuriaga@hotmail.com / servicioalcliente@labolab.com.ec

[www.labolab.com.ec](http://www.labolab.com.ec)

Quito - Ecuador