



ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DEL LITORAL

Facultad de Ingeniería en Mecánica y Ciencias de la Producción

“Caracterización del Proceso de Fermentación del Cacao Variedad Nacional Mediante el Uso de Técnicas Moleculares y de Detección de Compuestos de Aroma”

TRABAJO FINAL DE GRADUACIÓN

(Tesis de Grado)

Previo a la obtención del Título de:

INGENIERAS DE ALIMENTOS

Presentado por:

Mónica Lissette Prado Lince

Cinthya Sulay Zambrano Vera

GUAYAQUIL – ECUADOR

AÑO: 2015

AGRADECIMIENTO

A Dios, por guiarme con sabiduría y amor durante esta etapa universitaria. A mis padres Mónica y Erwin, quienes me han brindado su apoyo incondicional y fuerza, cuyo amor ha sido pilar fundamental, el cual me ha logrado cada meta propuesta. A mis hermanos Javier y Juan Diego.

A una persona muy especial en mi vida, Michael Fajardo quien me ha acompañado durante todo el desarrollo de este trabajo, por sus ánimos y apoyo en todo momento.

A mi director de tesis, Ph.D. Juan Manuel Cevallos, por la confianza depositada en mí, por su ayuda y por la dirección de este trabajo. Al

CIBE (Centro de Investigaciones Biotecnológicas del Ecuador), por las facilidades brindadas para el desarrollo de esta investigación, en especial al personal del área de Fitopatología.

A mis amigos, quienes de una u otra manera, han colaborado con este trabajo.

Mónica Lissette Prado Lince

DEDICATORIA

A Dios, quien con sus bendiciones y fortaleza ha permitido la culminación de este trabajo. A mis padres, quienes siempre me inculcaron el valor de la responsabilidad, enseñándome cómo afrontar y vencer los obstáculos sin decaer. A mis hermanos, por siempre brindarme su apoyo. A mi familia. A mi mejor amigo y enamorado, quien siempre me apoyo desde el inicio de este trabajo de graduación.

Mónica Lissette Prado Lince

AGRADECIMIENTO

A mi familia, por su ejemplo y esfuerzo.

A mis amigos, por su apoyo y compañía.

Al director, Ph.D. Juan Manuel por su guía y compromiso.

A todo el personal del CIBE por su gran ayuda.

A Dios, por estar siempre ahí.

Sulay Zambrano Vera

DEDICATORIA

A Dios, el único que hace lo imposible posible.

Sulay Zambrano Vera

TRIBUNAL DE SUSTENTACIÓN



M.Sc. Jorge Duque R.
DECANO DE LA FIMCP
PRESIDENTE



Dr. Juan Manuel Cevallos C., Ph.D.
DIRECTOR DEL TFG

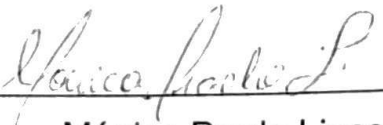


M.Sc. Haydee Torres C.
VOCAL

DECLARACIÓN EXPRESA

La responsabilidad del contenido desarrollado en el presente Trabajo Final de Graduación nos corresponde exclusivamente; y el patrimonio intelectual del mismo a la ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DEL LITORAL"

(Reglamento de Graduación de la ESPOL)


Mónica Prado Lince


Cynthia Zambrano Vera

RESUMEN

Este trabajo se basó en la importancia que tiene el cultivo de cacao en la economía del Ecuador; debido a que genera divisas de exportación a grandes mercados especializados de chocolate.

Según el INIAP, el cacao fino de aroma, representa tan solo el 5% de la oferta mundial, porcentaje del cual el 65% proviene de este país. Si bien antes se reconocía a Ecuador como productor 100% de “cacao fino y de aroma”, en la actualidad este porcentaje ha disminuido debido a su deficiente manejo post-cosecha, especialmente durante los procesos de fermentación y secado, los cuales son de gran incidencia para lograr un producto de mayor calidad.

El presente trabajo se basó en la identificación de los microorganismos productores de los principales compuestos aromáticos liberados en la fase de fermentación durante los primeros 4 días de este proceso, a fin de mejorar la calidad sensorial de las almendras, mediante una correcta fermentación de los granos de cacao. Cabe recalcar que la variedad utilizada es la Nacional debido a que la misma representa uno de los principales rubros dentro del sector agropecuario, llegando a ser una de las más importantes fuentes de ingresos para el país.

Para caracterizar el proceso de la fermentación, se tomaron muestras de granos de cacao variedad Nacional durante cada uno de los primeros 5 días (incluyendo el día cero de fermentación) y se realizaron los respectivos aislamientos microbianos de cada muestra, para luego realizar la identificación de los mismos mediante secuenciación de las regiones conservadas del ADN. Luego de esto se realizaron ensayos concernientes a la calidad aromática del grano. Para esto, almendras frescas previamente sometidas a luz UV a fin de lograr una esterilización pero sin que se vean afectadas mayormente los granos, fueron fermentadas con los respectivos aislados durante 4 días a nivel de laboratorio; incubándolas en condiciones normales de humedad y temperatura, similares a las utilizadas por agricultores en el campo. Luego de esto se procedió al procesamiento de los compuestos extraídos con la ayuda de un cromatógrafo de gases por el método Microextracción en Fase Solida o SPME.

Con el manejo de tablas ANOVA con 95% de confianza se logro diferenciar aquellos microorganismos que al ser inoculados solos sobre los granos frescos y estériles de cacao provocaban un aumento significativo en cuanto a la formación de compuestos de aroma en diferencia cuando se corría el proceso de fermentación normal, así mismo gracias a la investigación bibliográfica utilizada se justifico cuales eran los perfiles aromáticos mas

apetecidos por los diferentes mercados a los que se dirige el grano una vez tratado.

Finalmente se llegó a la conclusión de que compuestos tales como los benzaldehídos se ven favorecidos por la presencia de *Bacillus* que tienen su mayor incidencia durante la primera fase de la fermentación; así mismo se observa un aumento en la concentración de aldehídos y bencenos por la acción de ciertos acetobacters (presentes sobretudo durante los días dos y tres).

Pero gracias a este estudio no solo se pudo destacar cuales eran los principales microorganismos formadores de compuestos aromáticos deseables sino que también se pueden observar aquellos indeseables, como es el caso del 1-Butanol, 3-methyl-, aunque se reporte solo como consumo y no como producción.

ÍNDICE GENERAL

	Pág.
RESUMEN.....	ii
ÍNDICE GENERAL.....	v
ABREVIATURAS.....	vii
ÍNDICE DE FIGURAS.....	viii
ÍNDICE DE TABLAS.....	x
INTRODUCCIÓN.....	1

CAPÍTULO 1

1. MARCO TEÓRICO	3
1.1. El cacao en el Ecuador.....	3
1.2. Procesamiento de cacao	11
1.3. Principales productos del cacao	27
1.4. Organismos Fermentadores de Cacao.....	28
1.5. Formación del aroma del Cacao.....	37

CAPÍTULO 2

2. GENERALIDADES.....	45
2.1. Planteamiento del problema.....	45
2.2. Justificación	46

2.3. Objetivo general	48
2.4. Objetivos específicos.....	48
2.5. Hipótesis.....	48

CAPÍTULO 3

3. METODOLOGÍA	49
3.1. Identificación molecular de géneros fermentadores de cacao.....	50
3.2. Fermentación.....	69
3.3. Identificación de Compuestos de aroma.	75
3.4. Análisis estadístico.	77

CAPÍTULO 4

4. ANÁLISIS DE RESULTADOS.....	79
--------------------------------	----

CAPÍTULO 5

5. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	107
---	-----

BIBLIOGRAFÍA

ANEXOS

ABREVIATURAS

spp.:	Especies
et al.:	Colaboradores
PCR:	Reacción en cadena de la polimerasa
ADN:	Ácido Desoxirribonucleico
ARN:	Ácido Ribonucleico
Min:	Minutos
Seg:	Segundos
pH:	Potencial de hidrógeno
UV:	Ultravioleta
EDTA:	Etilendiaminotetracético
cADN:	ADN complementario
ARNm:	ARN mensajero
A:	Adenina
T:	Timina
G:	Guanina
C:	Citosina
TAE:	Tris-Acetato-EDTA
°C:	Grados Celsius
GC-MS:	Cromatografía de Gases acoplada a Espectrometría de Masas
SPME:	Microextracción en fase sólida.
dATP:	desoxiadenosina trifosfato
dCTP:	desoxicitidina-5'-trifosfato
dTTP:	timidina-5'-trifosfato
dGTP:	desoxiguanosina-5'-trifosfato
bp:	Pares de bases
µm:	Micrómetros
µl:	Microlitros
µg:	Microgramos
ml:	Mililitros
mm:	Milímetros
KCl:	Cloruro de Potasio
MgCl ₂ :	Cloruro de Magnesio

ÍNDICE DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1.1	Total Nacional de Superficie Sembrada de Cacao..... 6
Figura 1.2	Evolución de las Exportaciones totales de cacao en el Ecuador7
Figura 1.3	Elementos y productos..... 12
Figura 1.4	1. Masa de granos de Eacao iniciando elProceso de fermentación. 2. Masa de granos de cacao con 4 días de fermentación..... 13
Figura 1.5	Principales cambios en la semilla de cacao durante la fermentación..... 18
Figura 1.6	Fermentación en cajas..... 19
Figura 1.7	Fermentación en montón..... 20
Figura 1.8	Remoción del grano para un secado sea uniforme..... 21
Figura 1.9	Diagrama tecnológico de la elaboración del chocolate y sus subproductos..... 24
Figura 1.10	Termociclador..... 32
Figura 1.11	Representación esquemática de: a. componentes básicos para llevar a cabo una PCR. b. fases de la PCR. c. resultado obtenido tras el primer ciclo de amplificación (la cadena recién formada se representa de color más claro)..... 34
Figura 3.1	Levadura aislada en PDA..... 51
Figura 3.2	Tinción de aislados Bacterianos..... 51
Figura 3.3	Procedimiento de PCR..... 59
Figura 3.4	Electroforesis..... 59
Figura 3.5	Grano de cacao triturado con nitrógeno líquido..... 70
Figura 3.6	Inoculación de los microorganismos en el grano estéril..... 73
Figura 3.7	Grano de cacao inoculado..... 74
Figura 3.8	1. Microfibra inyectada en el vial con muestra. 2. Microfibra inyectada en el cromatógrafo..... 76

Figura 3.9	Cromatógrafo de gases acoplado a un espectrómetro de masas (GC-MS).....	77
Figura 4.1	Bacteria gram-negativa observada bajo el lente del microscopio.	80
Figura 4.2	Levadura no identificada observada bajo el lente del microscopio.....	80
Figura 4.3	Análisis de Electroforesis de la presencia de adn total en un grupo de las Muestras aisladas.....	81
Figura 4.4	Cromatograma, granos de Cacao sin esterilizar.....	86
Figura 4.5	Cromatograma, granos deCacao esterilizado usando luz uv...	86
Figura 4.6	Cromatograma, granos de Cacao esterilizado usando vapor mediante un autoclave.....	87

ÍNDICE DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1 Exportaciones Totales de Cacao en el 2013.....	7
Tabla 2 Composición Química de Granos de Cacao.....	9
Tabla 3 Reactivos para la Extracción de ADN Genómico Bacteriano.....	54
Tabla 4 Reactivos que Conforman el Buffer de Extracción.....	57
Tabla 5 Descripción de Iniciadores.....	60
Tabla 6 Master Mix para PCR- PRIMERS 27F – 1492R.....	60
Tabla 7 Master Mix para PCR- PRIMERS 968F – 1378R.....	61
Tabla 8 Programa para Realizar PCR Usando Los PRIMERS 27F Y 1492R.....	64
Tabla 9 Programa para Realizar PCR Usando los PRIMERS 968F 1378R.....	65
Tabla 10 Muestras Identificadas Mediante el Uso de Enzimas de Restricción.....	67
Tabla 11 Mix de la Enzima de Restricción Hindiii.....	68
Tabla 12 Temperaturas de Fermentacion de Granos de Cacao.....	75
Tabla 13 Microorganismos Identificados Día 1 de Fermentación.....	82
Tabla 14 Microorganismos Identificados Día 2 de Fermentación.....	83
Tabla 15 Microorganismos Identificados Día 3 de Fermentación.....	84
Tabla 16 Microorganismos Identificados Día 4 de Fermentación.....	85
Tabla 17 Comparación de Las Concentraciones de Compuestos de Aromas en Granos de Cacao Con Diferentes Métodos de Esterilización.....	89
Tabla 18 Compuestos Aromáticos Con Valor P < A 0,05 Durante el Dia 0 ee Fermentación.....	92

Tabla 19	Compuestos Aromáticos Con Valor $P < A$ 0,05 Durante el Día 1 de Fermentación.....	94
Tabla 20	Compuestos Aromáticos Con Valor $P < A$ 0,05 Durante el Día 2 de Fermentación.....	95
Tabla 21	Compuestos Aromáticos Con Valor $P < A$ 0,05 Durante el Día 3 de Fermentación.....	97
Tabla 22	Compuestos Aromáticos Con Valor $P < A$ 0,05 Durante el Día 4 de Fermentación.....	99

INTRODUCCIÓN

Para la caracterización del proceso de fermentación del cacao variedad Nacional, esta tesis de grado se ha desarrollado bajo los siguientes tópicos:

En el capítulo uno, se hace una breve reseña histórica del cultivo de cacao en el Ecuador, así como también su situación actual en comparación al estándar mundial, además de una breve explicación del tratamiento postcosecha del grano y de las técnicas de microbiología, química analítica y biología molecular correspondiente.

En el capítulo dos se realiza el planteamiento del problema, definición de objetivos e hipótesis.

En el capítulo tres se visualiza la metodología utilizada, tanto para el aislamiento como para la identificación de los microorganismos hallados durante los días cero, uno, dos, tres y cuatro de fermentación de los granos de cacao. Posterior a esto se describe la fermentación de los granos realizada a nivel de laboratorio, adaptando los parámetros usados normalmente en campo. Además el uso del cromatógrafo GC-MS y la técnica SPME para análisis y detección de compuestos volátiles.

De acuerdo a la revisión de la bibliografía y al análisis y tratamiento de los granos realizado, en el capítulo cuatro se pretende hacer una comparación entre los compuestos generados durante la fermentación in vitro con aquellos que han sido obtenidos en un proceso de fermentación normal, además de realizar un breve tratamiento estadístico de datos obtenidos a fin de poder establecer diferencias significativas entre los compuestos de aroma que producen los microorganismos por día de fermentación.

CAPÍTULO 1

1. MARCO TEÓRICO

1.1. El Cacao en el Ecuador

Características Generales

El cacao (*Theobroma cacao* L) es un árbol tropical de flores pequeñas y frutos leñosos de forma alargada que crecen sobre la copa de los árboles. Su origen proviene de las selvas de América Central y del Sur, y por ende crece mejor en climas ecuatoriales debido a sus precipitaciones anuales y a su temperatura (entre 25 - 28 grados centígrados).[1]

De acuerdo a su genotipo, el cacao se ha clasificado en tres grandes grupos: los Criollos, que si bien en el siglo XVIII dominaban el mercado en la actualidad existen muy pocos árboles puros; los Forasteros, al cual pertenecen un sinnúmero de variedades silvestres y semi-silvestres entre las cuales se

encuentra el Arriba o Cacao Nacional de Ecuador. Y los Trinitarios, que son una mezcla entre los Criollos y los Forasteros, y que su cultivo se extiende desde Venezuela hasta llegar a Ecuador, Camerún, Samoa, Sri Lanka, Java y Papúa Nueva Guinea. [2]

A nivel mundial, al grano de cacao se lo ha dividido en dos grandes categorías: cacao “fino de aroma” y cacao “al granel” o “común”. El primero es producido por las variedades Criollo y Trinitario, mientras que el cacao “común” proviene generalmente del Forastero, y se dice generalmente debido a que existen excepciones, como es el caso del cacao cultivado en el Ecuador que, aunque si bien pertenece a la variedad Forastero, sus almendras son consideradas fino o de aroma. Otra excepción bastante conocida es la del caso de Camerún, donde la variedad Trinitario es considerado cacao común.[3][4]

En el país, el cacao fino o de aroma es producido por la variedad Nacional, que es un tipo único de la variedad Forastero debido a su rápida fermentación y posee un gran reconocimiento a escala mundial por producir un chocolate suave y de buen aroma y sabor.

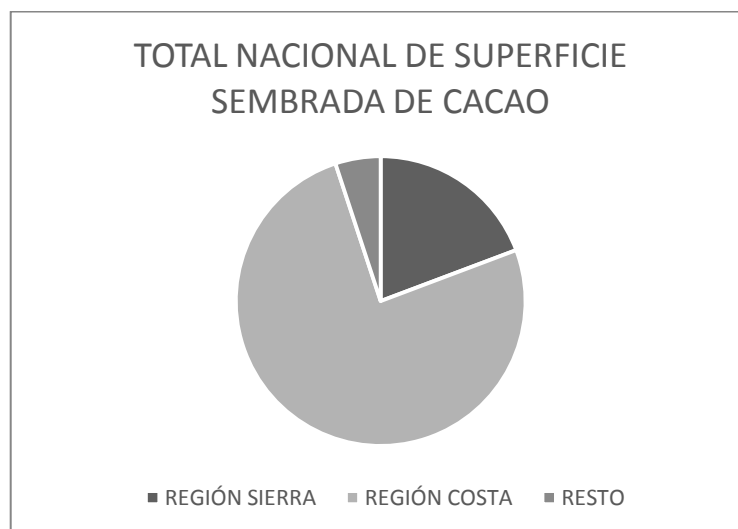
Cabe recalcar que tan solo el 5% de la oferta mundial de cacao corresponde a la de cacao fino y de aroma, cuyas características de

aroma y sabor superior son bastante apetecidas por los grandes fabricantes de chocolate. [5] [6]

Cultivo y disponibilidad

En el Ecuador, el cacao fino o de aroma es un tipo único, subgrupo de la variedad Nacional, que a su vez, es un tipo único con similitudes genéticas a la variedad Forastero. Famoso debido a su rápida fermentación, el cacao Nacional posee un gran reconocimiento a escala mundial por producir un chocolate suave y de buen aroma y sabor. [5][3]

Así, en este país, la región en la que se concentra la mayor superficie sembrada de cacao es la región Costa, que en el último Censo Nacional Agropecuario registró casi el 76% de la superficie total a nivel nacional. Siendo Guayas la provincia con mayor superficie cosechada (88.047 Ha), seguida por Los Ríos (82.679 Ha), Manabí (64.374 Ha) y Esmeraldas (48.432 Ha). [7]



TOTAL NACIONAL	191.272
REGIÓN SIERRA	36.865
REGIÓN COSTA	144.729
RESTO	9.678

Fuente: iii Censo Nacional Agropecuario, 2012

**FIGURA 1.1 TOTAL NACIONAL DE SUPERFICIE SEMBRADA
DE CACAO**

Según la herramienta para consulta estadística del Banco Central del Ecuador, en el último año se han registrado 19.80 toneladas de producto para la elaboración del cacao o fabricación del chocolate para exportación; así mismo, se registran 75.49 toneladas de grasa y aceite de cacao para exportación. [8]

TABLA 1
EXPORTACIONES TOTALES DE CACAO EN EL 2013

SUBPARTIDA NANDINA	DESCRIPCIÓN	TONELADAS	FOB-DÓLAR	%/TOTAL FOB-DÓLAR
8438202000	PARA LA ELABORACIÓN DEL CACAO O FABRICACIÓN DE CHOCOLATE	19.93	563.91	100.00
1804002000	GRASA Y ACEITE DE CACAO	116.21	967.48	100.00

Fuente: Banco Central Del Ecuador, 2014

La gráfica a continuación se muestra el cuadro de crecimiento y proyecciones en cuanto a las exportaciones de cacao y sus derivados desde el año 2002 hasta el 2016.



**FIGURA1.2 EVOLUCIÓN DE LAS EXPORTACIONES TOTALES
DE CACAO EN EL ECUADOR**

Si bien, el Ecuador fue considerado por mucho tiempo como el productor del mejor cacao del mundo, diversas situaciones, como el hecho de que la mayoría de las plantaciones de cacao son viejas e incorrectamente, lo cual repercute en un bajo rendimiento (promedio nacional: 5-7 qq/ha); además de un mal manejo post-cosecha, han provocado la pérdida paulatina de este reconocimiento. Es por esto que, en la actualidad, el MAGAP está impulsando el Proyecto de Reactivación de Café y Cacao Ecuatoriano de la Subsecretaría de Agricultura, el cual tiene por objetivo el aumento de la oferta exportable de 150.000 a 250.000 TM/año, lo cual provocará un aumento en las divisas a cerca de USD 300 millones anuales. [9]

Composición química

Los principales componentes del grano de cacao son agua, grasa, compuestos fenólicos, materia nitrogenada (proteínas y purinas incluyendo teobromina y cafeína), almidón y otros carbohidratos, además de materia inorgánica. Dichos compuestos, así como también la calidad de los granos, dependerán de factores intrínsecos y extrínsecos, como lo son el tipo genético; origen y

características geográficas; grado de madurez, de fermentación y de secado. [10]

TABLA 2
COMPOSICIÓN QUÍMICA DE GRANOS DE CACAO

COMPONENTES %	A	B	C
Agua	5.0	4.5	8.5
Grasa	54.0	1.5	3.5
Cafeína	0.2	-	-
Teobromina	1.2	1.4	-
Polihidroxifenoles	6.0	-	-
Proteína Bruta	11.5	10.9	25.1
Mono y Oligosacáridos	1.0	0.1	2.3
Almidón	6.0	-	-
Pentosanos	1.5	7.0	-
Celulosa	9.0	26.5	4.3
Ácidos carboxílicos	1.5	-	-
Otras sustancias	0.5	-	-
Cenizas	2.6	8.0	6.3
(A) Composición de granos fermentados y desecados al aire (B) Cáscaras de cacao (C) Gérmenes o radículas de cacao			

FUENTE KIRK R. S., Composición y Análisis de Alimentos de Pearson, págs. 464 – 465, México D.F.

Grasa

El grano de cacao fresco es muy rico en grasa, lo cual a nivel comercial es de gran importancia, ya que granos con alto contenido

de la misma podrían provocar un aumento en el tiempo normal de fermentación.

Los principales ácidos grasos constituyentes del cacao son el oleico, laúrico, palmítico, esteárico y aráquico. La proporción en la que se halla la materia grasa total en las almendras va a depender de la variedad de Cacao; así el tipo Forastero tiene un porcentaje de más del 52% de grasa total, al contrario del fino y de aroma, cuyo porcentaje oscila en menos del 50%. [11]

Alcaloides

La teobromina y la cafeína son los principales constituyentes del contenido total de alcaloides en el cacao (más del 99%). Dichos compuestos se encuentran ligados a los taninos, que son los responsables de la coloración violeta de los cotiledones. El contenido de teobromina y cafeína le dan propiedades estimulantes al cacao. [10]

Proteínas y aminoácidos

Del contenido de nitrógeno total en las almendras frescas, cerca del 60% corresponde a proteína en estado puro, mientras que en la fracción no proteica se tiene a los aminoácidos y escasa cantidad de nitrógeno amídico y amoniaco. Así mismo, se han identificado

una serie de enzimas, las mismas que son eliminadas durante los procesos posteriores. [10]

1.2. Procesamiento de cacao

Procesamiento del grano de cacao.

El cacao es el ingrediente principal para la elaboración del chocolate. La transformación del cacao en grano a chocolate es un proceso largo, pero relativamente poco complejo.

Cosecha

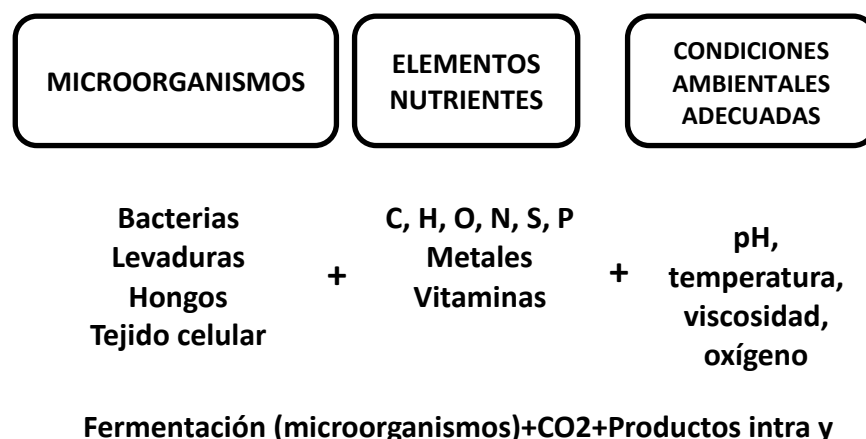
La primera etapa de todo este proceso de elaboración involucra a los productores de este fruto, los cuales se encargan de recolectar las mazorcas maduras y transportarlas a lugar donde serán fermentadas las almendras. La cosecha debe ser efectuada en intervalos de 10 a 15 días. [12]

Desgrane

El desgrane, operación que consiste en partir las mazorcas y extraer los granos o almendras cubiertos de una pulpa blanca (mucílago), los cuales serán sometidos a fermentación, proceso de interés y objeto de estudio en esta tesis el cual será detallado más

adelante. El tiempo entre el desgrane y la puesta en fermentación de los granos no debe superar las 24 horas.

Fermentación



FUENTE: BECKETT, 1994

FIGURA 1.3 ELEMENTOS Y PRODUCTOS

El proceso que continua luego del desgrane es la Fermentación ,proceso bioquímico cuyo substrato es la pulpa blanca, una mezcla de tejidos vegetales rica en azúcares (glucosa, fructosa y sucrosa), sales, pentosanos, ácidos orgánicos y proteínas, el cual consiste en amontonar los granos durante varios días, en el país este proceso dura 7 días, con el objetivo de que los microorganismos descompongan el mucilago, aumentando la temperatura que dará lugar a la muerte del embrión del grano, se inicien los cambios bioquímico y procesos enzimáticos en el interior de las almendras,

este conjunto de reacciones será el responsable de la disminución del sabor amargo por la pérdida de teobromina y de la formación de los compuestos precursores del sabor característico del chocolate. [13]; [14]

De acuerdo a FORSYTH & QUESNEL [15] los procesos que tienen lugar durante la fermentación comprende dos fases definidas y distintas. La fermentación o hidrólisis y la Oxidación.

La fermentación se da en dos etapas, la primera etapa se realiza en condiciones anaerobias (sin presencia de oxígeno) con producción de alcohol y ácidos, liberando calor y termina en una segunda etapa en condiciones aeróbicas (en presencia de oxígeno). [16]



Fuente: Manual Del Beneficio Del Cacao 2008

FIGURA 1.4 MASA DE GRANOS DE CACAO INICIANDO EL PROCESO DE FERMENTACIÓN. 2. MASA DE GRANOS DE CACAO CON 4 DÍAS DE FERMENTACIÓN

Fermentación Alcohólica

La primera etapa se denomina fermentación alcohólica. La pulpa es rica en carbohidratos y tiene un pH bajo. En esas condiciones se favorece el desarrollo de levaduras y se produce en condiciones anaeróbicas, en esta etapa se fermentan los azúcares presentes en la pulpa de los granos transformándose en alcohol y anhídrido carbónico, degradando la pectina, lo que modifica la textura del grano y elimina el ácido cítrico, lo que trae como consecuencia una disminución de la acidez. Por otro lado, el conjunto de levaduras consume el oxígeno, creando un ambiente anaerobio que favorece el desarrollo de bacterias lácticas esto ocurre en las primeras 48 horas. [12]

Las levaduras contienen enzimas del tipo pectinolítico, lo que les permite hidrolizar las pectinas, ocasionando la disminución de la viscosidad de la pulpa de mucílago y favoreciendo la entrada de aire. Con este ambiente aerobio y menos ácido debido al consumo de ácido cítrico se favorece el desarrollo de bacterias acéticas. Durante este periodo ocurren procesos bioquímicos en los cuales los granos amontonados se contaminan de bacterias acéticas inoculadas por los insectos denominados moscas de la fruta.

Fermentación Acética

Durante esta etapa de la fermentación ocurre un cambio importante en lo que respecta a los productos del proceso, intervienen las bacterias acéticas, las cuales transforman el etanol producido por las levaduras en ácido acético.

La producción de ácido acético genera un aumento de temperatura hasta los 45 °C, esta transformación vuelve permeable las paredes celulares del grano, permitiendo la entrada de oxígeno y la interdifusión de los componentes del jugo celular lo que mata al embrión o germen del grano, dando lugar a reacciones químicas en las cuales las enzimas se ponen en contacto con las proteínas y polifenoles provocando la disminución del amargor y astringencia. Ocurren cambios profundos en los pigmentos purpuras cianidinglucosidos. Este proceso es el primer paso en el desarrollo del sabor y aroma del cacao lo cual será de importancia en la calidad del chocolate. [17]

Esta fase hidrolítica ocurre a temperaturas cercanas a 45 °C y con pH de 4,0 a 5,0. El tiempo requerido para la muerte del grano de cacao varía de dos a cinco días, dependiendo de las condiciones en que se encuentran los granos.

Oxidación

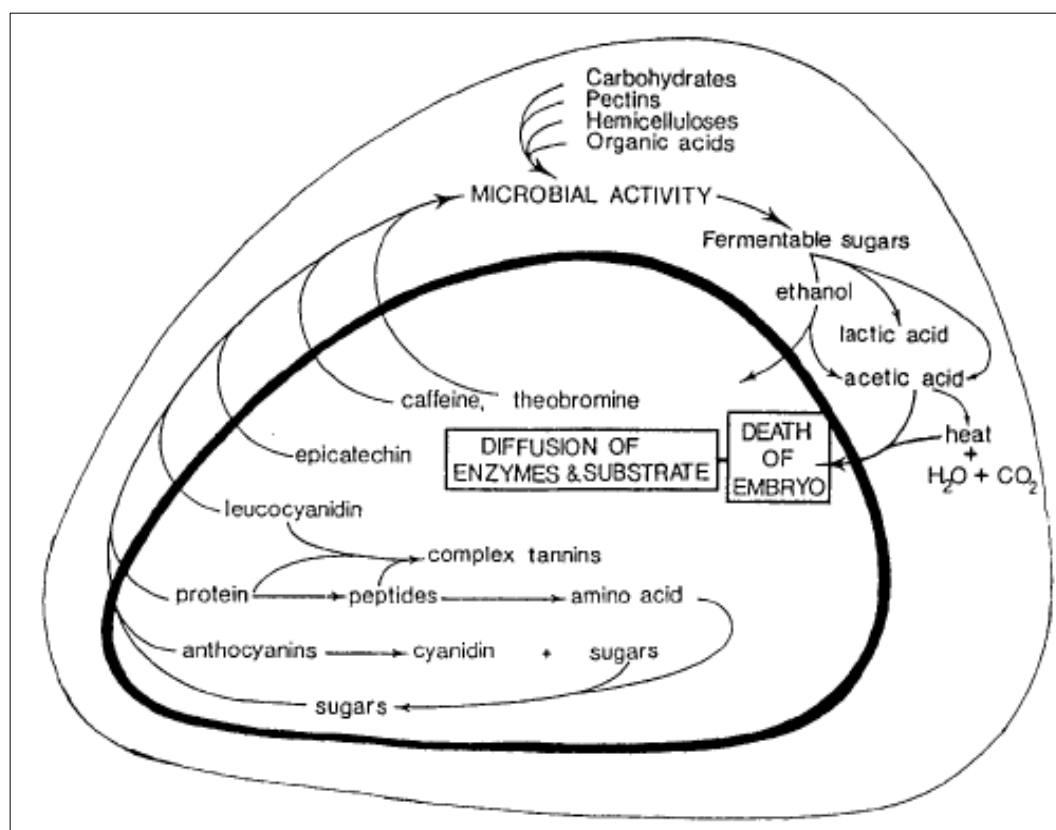
Fase seguida de la anaeróbica hidrolítica. Estas dos fases pueden ocurrir en diferentes granos en momentos distintos y en un mismo momento en diferentes partes de un grano. La etapa de oxidación puede continuar en la fase de secado. Esta fase consiste en la oxidación y condensación química de los compuestos fenólicos en productos complejos insolubles, esta etapa continua hasta que el contenido de humedad se reduce hasta el punto que impide que prosiga la actividad enzimática. [14]

Según VIVAS & REYES [18] todas etapas de la fermentación están acompañadas de cambios de coloración del grano o almendra. El color en la superficie de los granos no es uniforme, debido a que el pigmento esta contenido solamente en una célula de cada diez del tejido del cotiledón. Luego de la muerte del embrión solo la parte central muestra los puntitos, y la parte exterior muestra un color purpura. Posteriormente el color va desapareciendo tornándose en un grano de color pálido debido a la descomposición de los cianidínglucosidos púrpuras.

Durante esta fase oxidativa el color de la superficie del grano se vuelve pardo, conforme se reduce el contenido de humedad durante el proceso de secado.

La fermentación termina cuando los granos se ven hinchados, el embrión del grano ha muerto, el exceso de humedad se ha reducido de manera considerable y la temperatura desciende a la del medio ambiente. Un indicador de una fermentación satisfactoria es la presencia de un anillo periférico de color pardo en la almendra, con lo cual los granos pueden ser secados.

Según CROS [19], el proceso de fermentación puede verse afectado por varios factores, entre los cuales se puede mencionar: el origen genético del cacao, método de fermentación, tiempo de fermentación, frecuencia de remoción, factores biológicos y factores químicos. Durante el tratamiento pos cosecha numerosos nuevos compuestos aparecen, que en su mayoría evolucionan acorde a una cinética de campana con contenidos máximos a los 4 días de fermentación,



Fuente: López & Dimick, 1996.

FIGURA 1.5 PRINCIPALES CAMBIOS EN LA SEMILLA DE CACAO DURANTE LA FERMENTACIÓN.

Métodos de fermentación.

En Ecuador diversos autores señalan, varios métodos de fermentación; entre otros métodos usados se encuentran: montones, sacos o tinas, y tendales. [20]

Cajas: el método más utilizado en el país, el tamaño de las cajas dependerá de la cantidad de cosecha, no se recomienda el uso de

teca o roble debido a que transmiten olores que se impregnan a las almendras. [21]



Fuente: Barrale, 2007

FIGURA 1.6 FERMENTACIÓN EN CAJAS

Montón: este proceso consiste en amontonar las almendras, sobre un piso de madera o cemento.[21]



Fuente: Barrale, 2007

FIGURA 1.7 FERMENTACIÓN EN MONTÓN

Sacos: Consiste en dejar las almendras o granos en sacos, generalmente de yute para que ocurra el proceso de fermentación. [21]

Secado

El secado es la operación en la cual se reduce la humedad del grano de cacao desde un 60% hasta aproximadamente un 8%, durante este proceso los granos obtienen su sabor y aroma característico y su color pardo o marrón. Este proceso además evita el crecimiento de hongos y la sobre-fermentación. Otras de las ventajas que ofrece el secado son: facilidad de transporte, manejo, almacenamiento y comercialización. [22]

BRANUDEAU [23] expresa que existen dos formas en la que se puede realizar el secado: la técnica de secado natural usando la luz solar o el secado artificial usando secadores mecánicos.

Secado natural.

Se aprovecha la radiación solar que suministra la temperatura para el secado de los granos de cacao y la continuación de algunos cambios que no han finalizado durante la fermentación. Generalmente los granos son colocados en tendidos para exponerlos por completo al sol.



Fuente: Manual Del Beneficio Del Cacao 2008

**FIGURA 1.8 REMOCIÓN DEL GRANO PARA QUE EL SECADO
SEA UNIFORME**

Secado artificial.

Se denomina así por utilizar otras fuentes de energía diferente a la luz solar para secar los granos de cacao. Este tipo de secado es mayormente utilizado en regiones cuyo clima es lluvioso durante las épocas de cosecha.

En el secado artificial se usa corriente de aire caliente y usa como fuente de calor: leña, carbón mineral o electricidad. Con este método el tiempo de secado puede variar entre 20 a 36 horas a temperaturas entre 50 y 60 °C.

Selección y Clasificación

Una vez terminado el secado se debe someter a los granos a una limpieza minuciosa eliminando cualquier material mezclado, granos mohosos o dañados por insectos. Para este proceso se usa generalmente tamices y ventiladores para soplar el polvo y los pedazos de cascarilla.[24]

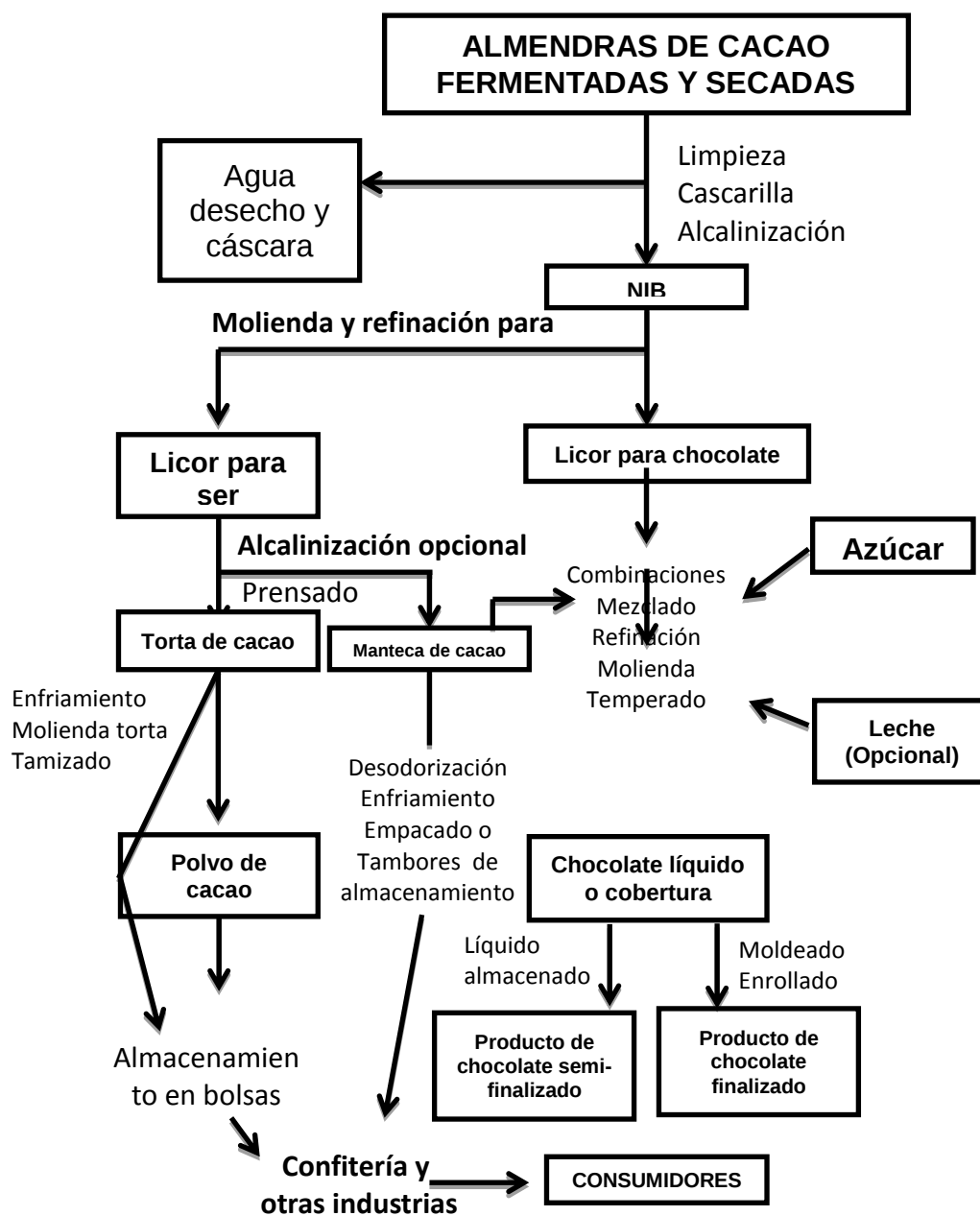
Según GRAZIANI, PORTILLO & BETANCOURT [25] la clasificación de los granos de cacao se refiere a la calidad del grano que imponen los países compradores y fabricantes de chocolate, mediante factores como apariencia física, humedad, contenido de materiales extraños, mohos, insectos, o por su sabor intrínseco.

Almacenamiento

Al cacao fermentado y seco debe dársele un manejo adecuado para evitar su deterioro o contaminación. Además de asegurarse que tenga una humedad del 8%. [12]

Otros procesos

La transformación industrial de los granos de cacao consta de una gran variedad de operaciones, que tienen como objetivo la elaboración de diferentes tipos de productos. Según el autor LIENDO [26], existen dos clases de procesadores de granos de cacao, aquellos que producen productos para la confitería, la fabricación de chocolate y otros su derivados del cacao, y los que se destinan a constituir materia prima para la industria alimentaria y farmacéutica; es decir industriales molineros y fabricantes de chocolates



Fuente: Liendo, 2005

FIGURA 1.9 DIAGRAMA TECNOLÓGICO DE LA ELABORACIÓN DEL CHOCOLATE Y SUS SUBPRODUCTOS

Limpieza

Este es el primer tratamiento que sufre el cacao, para eliminar cualquier material extraño como metales, piedras, vidrios entre otros. Posteriormente si existe aún la presencia de materiales extraños estos son eliminados de manera manual. Este proceso se lo realiza con la ayuda de un tamiz, la parte más importante de estos tamices son los rodillos que deben ser suaves y delicados. [26]

Tostado o Tueste

De acuerdo con MORENO & SANCHEZ [12] en esta etapa del proceso se desarrolla el aroma y sabor inicial del chocolate, a partir del contenido de humedad natural y el calentamiento que dan origen a una serie de reacciones químicas las cuales generan estos compuestos.

La temperatura del calentador donde se realiza el tostado puede alcanzar temperaturas de 135°C en un tiempo de una hora. Luego del tostado los granos pasan a un túnel de aire frío, donde se suspende el tostado rápidamente, evitando que las almendras se sobretuesten.

Descascarillado.

Es el proceso en el cual se elimina la cascara, que cubre la semilla del cacao. Este proceso posee dos variantes. El primero consiste en un tostado con cascara previo al descascarillado y el segundo la eliminación de la cascara. [26]

Molienda.

Según ENRIQUEZ [20] con esta etapa se inicia realmente el proceso de elaboración del chocolate. Los granos de cacao son molidos varias veces para eliminar la cascara; los trozos de cacao se convierten en un líquido fluido de color café de textura suave que es la denominada pasta o licor de cacao, materia prima para la elaboración de chocolate o cacao en polvo.

De acuerdo con el mismo autor en esta etapa se separan lo que es la industria de la grasa, la de cacao o polvo de cacao, y la de chocolate. Las condiciones en que se realiza la molienda, temperatura e intensidad, varían, esto dependerá del tipo de semilla de cacao usada y de las especificaciones que se requieran para el producto final.

Prensado

En el prensado de los granos, la manteca de cacao se separa del polvo. Se usan prensas hidráulicas a altas presiones que contienen mallas filtrantes de acero. Con este proceso se puede retirar entre el 20 y 30% de la grasa original de la semilla. La manteca sale por un lado y es solidificada al frío en cubos. El resto del cacao sale en bloques, y es a lo que se denomina torta. Esta torta se pulveriza con la finalidad de preparar el polvo de cacao,[26]

1.3. Principales Productos del Cacao

Semielaborados

- Licor de Cacao: pasta fluida que se obtiene del cacao a partir del proceso de molienda. Se utiliza como materia prima en la elaboración de chocolates y algunas bebidas alcohólicas.
- Manteca de Cacao (materia grasa del cacao): se conoce también como aceite de teobroma. Utilizada en la producción de cosméticos y farmacéuticos.
- Torta: Fase sólida del licor de cacao. Utilizada en la elaboración de chocolate.
- Polvo: la torta de cacao al ser pulverizada convirtiéndose en polvo de cacao, el cual es utilizado en la elaboración de bebidas de chocolate.

Elaborados

Los elaborados de cacao generalmente se refieren al chocolate, que puede ser en barra, tabletas, bombones coberturas, etc.

1.4. Organismos Fermentadores de Cacao

Métodos de identificación microbiana

La identificación microbiana consiste en la asignación de una bacteria o microorganismo a un taxón según una clasificación establecida, permitiendo determinar la especie a la cual pertenece la bacteria aislada previamente.

Métodos microbiológicos convencionales.

Medio de cultivo sólido

Un medio de cultivo es un método utilizado para el crecimiento y multiplicación de microorganismos como: bacterias, hongos, parásitos el cual ha sido preparado en un laboratorio con sustancias alimenticias artificiales que favorecen el proceso deseado. [27]

Un medio de cultivo contiene diversos nutrientes y las condiciones ambientales óptimas para el crecimiento microbiano según su tipo. [28] Para la obtención de un medio de cultivo sólido, a los caldos de cultivo se les agrega una sustancia denominada Agar, cuya

función es solidificante, esta sustancia es un polisacárido extraído de algas marinas.

Tinción de Gram

La tinción de Gram, es un método diferencial que permite clasificar a las bacterias según su morfología celular, forma, tamaño y reacción de GRAM de acuerdo al color de su tinción: clasificándolas en dos grupos: Gram + y Gram –[28].

En este método se usan 4 soluciones, cada una de las cuales cumple las siguientes funciones [28]:

- El cristal violeta, un colorante básico.
- Lugol, potencia o refuerza la acción del cristal violeta.
- Alcohol, decolora aquellas células que están teñidas.
- Solución de contraste (fucsina, safranina) que es la que va a diferenciar el color final.

La variación de color en la tinción de Gram se debe básicamente a la diferencia en la pared celular de las bacterias, que radica principalmente en 2 causas: La mayor cantidad de fosfolípidos que contiene la pared celular de las bacterias Gram -, y, la presencia de peptidoglucanos que se encuentran en mayor proporción en las bacterias Gram +.

De acuerdo con PRESCOTT [29] el alcohol en las bacterias Gram – extrae los lípidos de la pared, aumentando los poros y permitiendo la salida del colorante cristal violeta, de lo contrario en las bacterias Gram + ocurre una deshidratación de la pared disminuyendo sus poros y reteniendo el colorante.

La safranina, teñirá de color rojo o rosado las bacterias Gram – y las bacterias Gram + mantendrán el color azul violeta.

Métodos moleculares

En la actualidad las técnicas moleculares para la identificación de microorganismos están teniendo un auge muy importante. Las técnicas de Biología Molecular (BM) se basan en el análisis de los ácidos nucleicos extraídos de los microorganismos en forma directa o bien de una muestra conteniendo el microorganismo en cuestión.

Extracción de ADN bacteriano.

El principio que caracteriza la extracción de ADN, consiste en la lisis de las células cuyo ADN se necesita purificar. Esta lisis se realiza mediante el uso de detergentes aniónicos cuya función es solubilizar los componentes celulares. Esta rotura celular o lisis se realiza en presencia de sustancias o reactivos cuya función es de conservación, manteniendo la integridad del ADN, limitando la

acción de las DNAsas presentes en las células o contaminantes del medio. El ARN, que pudiese estar presente, se lo elimina mediante el tratamiento con ARNasa. Restos de la pared celular, polisacáridos, y proteínas restantes se eliminan por precipitación selectiva usando generalmente disolventes orgánicos tóxicos. Finalmente el ADN se aísla mediante precipitación, utilizando alcohol, y es disuelto en agua o una solución tamponada. [24]

PCR

PCR Simple

La reacción de la Cadena de la Polimerasa o llamada también por sus siglas PCR, es una técnica molecular utilizada actualmente para amplificar in vitro secuencias específicas de ácidos nucleicos a partir de cantidades muy pequeñas hasta niveles fácilmente detectables. [30] Esta técnica utiliza cebadores que hibridan con secuencias complementarias del molde del ADN por lo cual es una técnica sensible y específica. La PCR, es una técnica que realiza la replicación in vitro utilizando componentes similares a los de la replicación in vivo, estos son mezclados correctamente e incubados en un termociclador a temperaturas programadas. [31]



Fuente: Mónica Prado, Cibe

FIGURA 1.10 TERMOCICLADOR

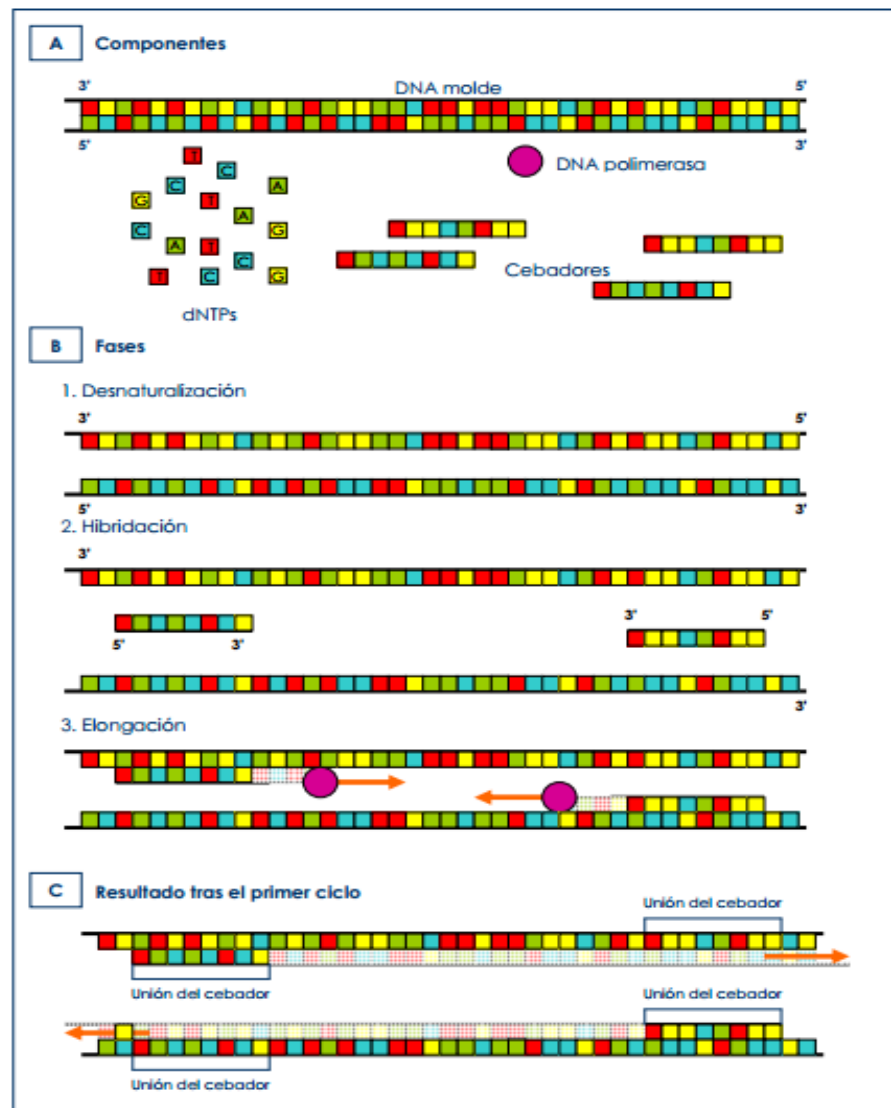
Etapas de la PCR.

El proceso que se realiza durante una PCR, se lo puede resumir en los siguientes pasos: a partir de un ADN molde, la enzima polimerasa incorpora los nucleótidos complementarios a partir de la zona de doble cadena originada por la unión de los cebadores al molde. El proceso de PCR, se lleva a cabo en tres fases, desnaturalización, hibridación y elongación, en los que los cambios de temperatura tienen vital importancia.

La desnaturalización es el primer paso, en el cual las dos cadenas de ADN se separan, esta reacción se lleva a cabo a temperaturas de alrededor de 94°C. A esta temperatura los puentes de

hidrógenos entre las bases nitrogenadas se logran romper y se obtiene dos simples hebras de ADN monocatenario. [32] La reacción se completa cuando todo el ADN bicatenario se convierte en monocatenario.

Hibridación, finalizada la desnaturalización la temperatura desciende, permitiendo que los cebadores se muevan libremente se unan por complementariedad al ADN molde, esto ocurre a temperaturas entre 35 y 60°C. Los enlaces más estables duran un poco más (los cebadores que se corresponden exactamente con el ADN molde) y es en ese fragmento de ADN bicatenario donde puede fijarse la polimerasa y empezar a copiar el ADN molde. [32]. La elongación o extensión es el último paso, en el cual la enzima polimerasa incorpora los nucleótidos complementarios a partir del extremo 3' libre de la región en la cual han hibridado los cebadores (la polimerasa añade dNTPs desde 5' hacia 3', leyendo el ADN molde desde 3' hacia 5', esta reacción se realiza a una temperatura de 72°C. en el caso de la Taq polimerasa. En la mayoría de experimentos de PCR es suficiente un tiempo de 1 min para conseguir una extensión completa. (10).



Fuente: Simpson, 1992

FIGURA 1.11 REPRESENTACIÓN ESQUEMÁTICA DE: A. COMPONENTES BÁSICOS PARA LLEVAR A CABO UNA PCR. B. FASES DE LA PCR. C. RESULTADO OBTENIDO TRAS EL PRIMER CICLO DE AMPLIFICACIÓN (LA CADENA RECIÉN FORMADA SE REPRESENTA DE COLOR MÁS CLARO)

Electroforesis

«Electro» se refiere a electricidad y «foresis», del griego phoros, significa «trasladar». Método empleados para separar moléculas (proteínas, isoenzimas, ácidos nucleicos) de acuerdo a su tamaño y carga neta mediante migración bajo la influencia de un campo eléctricos.

La electroforesis en gel es una de las técnicas más simples para obtener información del amplicón. Una molécula de ADN posee carga negativa, motivo por el cual este migra hacia el ánodo. [33]

Los ácidos nucleicos en el gel de agarosa pueden observarse mediante el uso de colorantes fluorescentes, lo que permite compararlos con patrones de concentración conocida. Los colorantes utilizados actúan mediante inserción entre los pares de bases del ADN.

En la actualidad se usan colorantes como, como SYBR Safe, SYBR Gold, SYBR Green I, Vista Green y Syto60, desarrollados específicamente para reducir los riesgos potenciales de mutagénesis.

La velocidad de separación y la resolución de los fragmentos de ADN están determinados por la concentración del gel de agarosa y del voltaje aplicado durante el proceso de electroforesis. [34]

Secuenciación

Tecnología establecida alrededor de los años 80, se ha convertido en una técnica básica para la identificación y caracterización de nuevas especies, provee detalles precisos de los ácidos nucleicos y su organización. Así también, existen programas que analizan y almacenan estas secuencias en una base de datos, la cual se encuentra disponible para la comunidad científica, esta base de datos permite comparar y analizar los niveles de homologías entre secuencias. (27)

El método de secuenciación utilizado es el desarrollado por Sanger en 1957, este método consiste en la incorporación de didesixinucleótidos marcados fluorescentemente a una cadena de ADN durante el proceso de copiado.

Estos didesixinucleótidos no poseen un grupo 3'-OH, el cual es necesario para la formación del enlace fosfodiéster que permite la unión de los nucleótidos, por lo cual interrumpe la elongación de la cadena cada vez que uno de estos se une; generándose secuencias de diferentes tamaños.

Estas cadenas pasan por un proceso en el cual se hacen migrar a través de un gel de poliacrilamida donde se separan por tamaños.

El equipo de secuenciación posee un dispositivo que permite captar la luz de los cuatro didesixinucleótidos. La lectura se la

realiza iniciando desde las secuencias más cortas hasta la secuencia completa, dando como resultado un gráfico de picos de emisión de luz en la posición de cada uno de los nucleótidos de la secuencia que se desea analizar. [35]

Chequeo por Enzimas de Restricción

Las enzimas de restricción son endonucleasas que reconocen una secuencia palindrómica específica (secuencias que se leen igual en ambas direcciones) de ADN de doble cadena y proceden a cortar los enlaces fosfodiéster del material genético del mismo.

La secuencia específica, conocida como secuencia diana tiene un tamaño generalmente comprendido de entre 4 y 6 nucleótidos. Los extremos que cortan la mayoría de las enzimas de restricción son llamados romos mientras que los que cortan otras son llamados cohesivos.[36], [37]

1.5. Formación del Aroma del Cacao.

Compuestos de aroma

A través del tiempo, los compuestos volátiles y los compuestos del sabor y aroma formados durante tratamientos post-cosecha de los granos de cacao han sido objeto de diferentes estudios y trabajos, apuntando a que la mayor formación de dichos compuestos surge

en las etapas de fermentación y secado; y en recientes investigaciones también en el tostado.

En la actualidad, el número total de compuestos identificados durante estos tratamientos asciende a cerca de quinientos, los mismos que han sido agrupados en 17 familias químicas diferentes.

Los compuestos predominantes hallados han sido las pirazinas que representan casi el 20 % del número total de compuestos en el aroma, seguidos por los esteres, que representan el 13 %, hidrocarburos 13 % y los ácidos en un porcentaje de 11/100.[23]

Es por esto que se han realizado trabajos en los cuales se ha aplicado el mismo protocolo de preparación de las muestras de cacaos, para que de esta forma quede en manifiesto las diferencias aromáticas entre las variedades Forastero, Trinitario y también las híbridas. Los resultados indican que la composición volátil y el perfil sensorial (degustación) presentan diferencias muy importantes. [19]

Un compuesto clave que contribuye con la calidad de las almendras de cacaos “finos” es el linalol, el mismo que se encuentra en cacaos provenientes de países como Ecuador,

Trinidad y Venezuela en una proporción de hasta ocho veces mayor en comparación a países como Ghana, Costa de Marfil y Brasil. Dicho compuesto es el responsable de las notas florales.

Antes de iniciar la fermentación, es decir al día cero, las almendras frescas poseen un aroma poco desarrollado, y los compuestos presentes son principalmente estireno (68 %) y el dimetil formaldehído (8.5 %). A diferencia de almendras bien fermentadas y secas, cuya fracción volátil es 10 veces superior. [38]

A continuación se presenta una lista de los compuestos típicos encontrados en las tres variedades, Forastero, Criollo y Nacional. Cabe recalcar que esta lista está basada en una investigación realizada en el Centro de Investigaciones Biotecnológicas del Ecuador en el año 2014 y que los resultados obtenidos no son conclusivos, y dependerá mucho de futuras investigaciones con su respectiva toma de muestras en otras partes del mundo.

- 1,3-Ciclohexadieno, que es un compuesto no aromático detectado en granos frescos de la variedad Criollo.
- α -Copaeno, que es un compuesto de notas frutales. Se encuentra en todas las variedades de cacao y en diferentes etapas.

- Ácido benzoico, encontrado en todas las variedades y en cualquier etapa, es un compuesto que protege a las almendras contra las infecciones bacterianas.
- Pentanol, se encuentra en cada una de las diferentes especies.
- Linalol. Este compuesto aromático se encuentra desde el primer día de fermentación hasta el último de secado del cacao Criollo. En almendras de la variedad Nacional se ha detectado nonanol en lugar de linalol.
- Acetato de Octenil, propio de Forastero, es un compuesto muy importante debido a su carácter como recurso energético.
- Eteno, propio del primer día de fermentación de todas las variedades. Es un compuesto muy importante ya que es el responsable de cambios asociados a textura y color.
- Benceno, detectado tan solo en Criollo y Forastero desde el primer día de fermentación. En el caso del Criollo se encuentra casi hasta el último día de secado, mientras que en el Forastero sólo hasta el segundo día.
- Succindialdeido. A partir del Segundo día de fermentación, es un compuesto que se encuentra en las variedades Criollo y Nacional.

- 2-Heptanona. Es un compuesto aromático encontrado después de dos días de fermentación en todas las variedades, sólo que el Criollo la tiene en una mayor concentración.
- Epoxylinolol, es un compuesto floral que solo ha sido detectado en los granos correspondientes al tercer día de fermentación de la variedad Criollo.
- Germacrene D, a partir del tercer día de fermentación en variedades Criollo y Forastero. Tiene propiedades antimicrobianas.
- Valenceno 1, índole y aromadendrene. Compuestos de aroma propios de la variedad Criollo, se presentan a partir del tercer día de fermentación.
- 3-Octen-1-ol. Detectado solo en Nacional, es un compuesto de aroma que aparece solo a partir del quinto día de fermentación.
- α -Terpineol, compuesto de sabor propio de la variedad Criollo después del primer día de secado.
- Bencilindol. Compuesto hallado en Nacional y Criollo en el Segundo día de secado. [39]

Técnicas de detección

Microextracción en Fase Sólida (SPME)

La SPME es una técnica importante en la química analítica utilizada para la preparación de muestras. Fue introducida por el profesor Janusz Pawliszyn de la Universidad de Waterloo en Ontario, Canadá, en el año de 1997.

Es básicamente un proceso de equilibrio, en el que se extraen los componentes orgánicos volátiles o semi-volátiles de la muestra mediante una fibra de sílice fundida que está recubierta por un solvente, el mismo que en su mayoría es un polímero; luego dichos analitos son emitidos por medio del uso de algún disolvente orgánico o temperatura. La utilidad de esta técnica radica en que puede aislar compuestos volátiles a partir de muestras acuosas que no podrían ser inyectadas directamente en el sistema cromatográfico. [40]

Las condiciones de equilibrio pueden ser descritas por la siguiente ecuación de acuerdo a las leyes de masa para un sistema de dos fases. [41]

$$C_o V_s = C_{\infty s} V_s + C_{\infty f} V_f \quad (1)$$

Dónde C_o : es la concentración inicial de la muestra

V_s : volumen de la muestra

V_f : volumen de la fibra

$C_{\infty f}$: concentración de equilibrio de la fibra

$C_{\infty s}$: concentración de equilibrio en la muestra

Así mismo, la constante de distribución analítica entre la fibra y la muestra matriz es:

$$K_{fs} = C_{\infty f} V_f / C_{\infty s} V_s \quad (2)$$

El número de moles extraídos por la capa en equilibrio puede ser expresada combinando las ecuaciones (1) y (2) de la siguiente forma:

$$n = C_{\infty f} V_f = (K_{fs} V_f V_s C_o) / (K_{fs} V_f + V_s) \quad (3)$$

Dónde K_{fs} es el coeficiente de distribución entre la fibra y la muestra.

Para un sistema de tres fases, donde el espacio de cabeza es incluido, las condiciones de equilibrio son dadas por la ecuación siguiente:

$$n = C_{\infty} V_f = (K_{fs} V_f V_s C_o) / (K_{fs} V_f + K_{hs} V_h + V_s) \quad (4)$$

Donde K_{hs} es el coeficiente de distribución entre la fibra y el espacio de cabeza. Gracias a la ecuación 4 se puede observar que sin importar donde se encuentre la fibra (en el espacio de cabeza o directamente en la muestra), la muestra se mantiene constante.

Una vez realizada la extracción, los compuestos capturados por la fibra pueden ser absorbidos térmicamente en el inyector de un cromatógrafo de gases (GC) para su separación y cuantificación adicional. También, compuestos de baja volatilidad pueden ser extraídos por fibras diseñadas para su uso con cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC). [41]

Aunque si bien para cada SPME es necesario que se lleve a cabo una nueva extracción, la ventaja principal, en comparación a preparaciones de muestra de forma tradicional, es que el uso de disolventes no es necesario, requiere pequeños volúmenes de muestra, y los analitos no se eliminan completamente. Además, presenta un bajo coste y puede ser automatizada.

CAPÍTULO 2

2. GENERALIDADES

2.1. Planteamiento del problema

En el Ecuador existen dos tipos de cacao, la variedad Nacional también denominada fino de aroma o cacao arriba y el ordinario. Siendo este país el primer productor de cacao fino de aroma, a escala mundial la variedad Nacional representa tan solo el 5% de la oferta mundial.

Uno de los problemas fundamentales en el cultivo de cacao en el Ecuador es el deficiente manejo post-cosecha especialmente durante la fermentación y el secado del grano, etapas críticas que tienen gran incidencia en la formación de aromas, característica principal que define la calidad del grano. Motivo por el cual, si bien antes se reconocía a Ecuador como productor 100% de “cacao fino

y de aroma”, en la actualidad este porcentaje ha disminuido alrededor del 75%.

El atributo sensorial del cual depende el precio de las almendras de cacao es el aroma del chocolate, generado por la interacción de alrededor de 400 compuestos volátiles, que se desarrollan durante las fases de fermentación y secado o que son propios de las almendras frescas de cacao. Una fermentación inadecuada o la falta de esta influirán de manera negativa en la calidad sensorial del grano.

2.2. Justificación

El cultivo de cacao en el país tiene gran importancia en la economía, ya que es fuente sostenible de materia prima para la industria del chocolate y genera divisas al ser un producto de exportación a grandes mercados como lo son Alemania con un total de 15441,81 toneladas al año siendo el país con mayor importación de granos de cacao, Bélgica con 6267,63 t, Francia con 18,91 t, Italia 4692,87 t, Reino Unido con 0,72 t, España con 1095,31 t, Japón con 3003,02 t y Estados Unidos con 61935,02.

En el 2012, se registró una exportación de cacao y sus elaborados por un total de 496.63 millones de dólares y 182794 toneladas.

El cacao ecuatoriano atraviesa uno de sus mejores momentos en lo que se refiere a exportaciones. Los miembros del sector cacaotero esperan cerrar el 2014 exportando un total de 230000 toneladas, unas 40000 toneladas más que el año anterior

El precio promedio por tonelada de granos de cacao durante el 2012 fue de USD 2392, elevándose durante el 2013 a USD 2700 y este año el precio incrementó a USD 3126, llegando actualmente a ser vendido en \$3400, esto según datos establecidos por la Asociación Nacional de Exportadores e Industriales de Cacao.

La finalidad del proyecto que se presenta es la mejora del proceso de fermentación de los granos de cacao, mediante el conocimiento de aquellos compuestos que son producidos por los diferentes microorganismos que intervienen en la fermentación y que poseen mayor incidencia en el aroma del Cacao variedad Nacional, para encontrar una metodología que mejore el producto final en el, teniendo resultados y teorías aplicables en donde se demuestre el efecto de cada microorganismo en la generación de aquellos compuestos que hacen que las características sensoriales de los granos de cacao sean de mayor calidad .

2.3. Objetivo general

Identificar los géneros de microorganismos presentes en los primeros 4 días de fermentación de granos de Cacao Nacional y determinar los compuestos de aroma que estos producen.

2.4. Objetivos específicos

Identificar los microorganismos que participan en los 4 días de fermentación de los granos de Cacao Nacional.

Identificar los compuestos de aroma generados por los microorganismos identificados durante los 4 primeros días de fermentación de los granos de Cacao Nacional.

2.5. Hipótesis

Existen géneros y especies de microorganismos específicos que intervienen en el proceso de fermentación y que son responsables de la generación del aroma de los granos de cacao.

CAPÍTULO 3

3. METODOLOGÍA

La investigación se la realizo en las instalaciones del Centro de Investigaciones Biotecnológicas del Ecuador (CIBE), ubicada en la Escuela Superior Politécnica del Litoral (ESPOL) campus Gustavo Galindo de la Ciudad de Guayaquil-Ecuador.

Las fases experimentales fueron realizadas en condiciones controladas de laboratorio, la variedad de cacao utilizada para esta investigación fue el cacao Nacional.

Las muestras fueron obtenidas mediante la colaboración del Ingeniero Robert Figueroa, Presidente de la Asociación de trabajadores agrícolas de cacao “Buena Suerte” ubicada en El Empalme km 8 Vía Guayas, la cual se dedica a exportar granos de cacaos fermentados y secos de la Variedad Nacional a países europeos como Francia principalmente.

3.1. Identificación molecular de géneros fermentadores de cacao

Aislamiento

Una vez obtenidos los granos de cacao de Variedad Nacional de los primeros cuatro días de fermentación, se procedió a la trituración de 10 gramos de almendras de cada día, con la ayuda de un mortero estéril, para posteriormente suspender el triturado en medio líquido en condiciones de laboratorio y por duplicado.

Las muestras de cada día de fermentación fueron suspendidas en 12 tubos Falcón con 10 ml de medio líquido: 4 tubos con PDB (Potato Dextrosa Broth, VER ANEXO A) con pH 4,5, 4 tubos con PDB pH 6, y 4 tubos con Extracto de Levadura (VER ANEXO B). Los pH del PDB fueron modificados con el objetivo de darle especificidad al medio, pH 4,5 para levaduras y pH 6 Para bacterias.

De los doce tubos inoculados 6, fueron incubados en condiciones aerobias, y a los 6 restantes se les colocó 1 ml de aceite mineral para crear una condición de anaerobiosis, los 12 tubos fueron incubados a una temperatura de 35 °C durante 5 días.

Una vez transcurrido los 5 días, a partir de cada tubo se realizó la primera siembra en superficie, en placa de siembra estéril, en placas con PDA (Potato Dextrosa Agar, VER ANEXO A). Las placas cuyas

muestras provenían de un tubo en condiciones de anaerobiosis, fueron incubadas en jarras anaeróbicas , la condición anaeróbica se creó con la ayuda de una vela, una vez que se colocaron las placas en el interior de la jarra, se encendió una vela en el interior y se cerró la jarra, este procedimiento reduce al 10% la cantidad de oxígeno presente en la jarra.



FUENTE: MÓNICA PRADO, CIBE

FIGURA 3.1 LEVADURA AISLADA EN PDA.

Las placas se mantuvieron en incubación durante 5 días a 35°C. De cada una de las placas, se seleccionaron todas aquellas colonias de levaduras o bacterias que presentaban morfología distinta entre sí. Una vez realizado una siembra por agotamiento de

cada colonia elegida en placas con PDA, se realizó un frotis, tinción e identificación visual con la ayuda de un microscopio, clasificándolas en bacterias o levaduras, y verificando que la colonia constituía un cultivo puro.



FUENTE: MÓNICA PRADO, CIBE

FIGURA 3.2 TINCIÓN DE AISLADOS BACTERIANOS

Al verificar que el cultivo era puro, las cepas de levaduras o bacterias fueron inoculadas a tubos con PDB, tubos de los cuales se obtuvo el pellet el cual será utilizado para la preservación de la muestra aún sin identificar y la extracción de ADN,

Para la preservación de la muestra se tomó una muestra del pellet y se lo inoculó en microtubo de 2ml que contenían una solución de PDB y Glicerol al 20%, la cual permite la conservación del

microorganismo, estos microtubos fueron preservados a una temperatura de -80 °C

Extracción de ADN

ADN bacteriano

Para la obtención de ADN de los aislados bacterianos obtenidos se aplicó el protocolo interno del CIBE de “Extracción de ADN genómico para aislados bacterianos. Los aislados fueron tratados con todas las medidas de seguridad adecuadas para evitar contaminación entre las muestras,

Previamente a la extracción, las muestras (pellet) fueron colocados en tubos de 2ml y resuspendidas en 1000ul de agua ultra pura a -80° C entre 24 a 48 horas.

Los reactivos que se usaron durante este proceso se muestran a continuación. (Tabla 3)

TABLA 3
REACTIVOS PARA LA EXTRACCIÓN DE ADN GENÓMICO BACTERIANO

REACTIVO	CONCENTRACION
Buffer TE	10mM Tris-HCl pH 8.00/ 1 mM EDTA
SDS	20%
CTAB/NaCl	10%CTAB/ 0,7MNaCl
NaCl	5M
Cloroformo-Isoamyl alcohol	24:1
Fenol-cloroformo-isoamyl alcohol	25:24:1
2-propanol	
Etanol	70%
Proteinasa K	20mg/ml
RNasa	

Elaborado Por: Mónica Prado

Fuente: Cibe

Se centrifugó el cultivo en los tubos de 2ml por 5 min a 100000PRM, para pelletizarlo (Centrífuga Eppendorf 5810R). Se retiró el sobrenadante,

Se adicionaron 567 ul de buffer TE, 30 ul de SDS al 20% y 3 ul de Proteinasa K, se mezcló bien en un vortex, y se incubo a 37°C en baño maría durante una hora.

Finalizado el periodo de incubación, se añadió 100 µl de NaCl, y se mezcló bien en vortex.

Posteriormente se colocó 80 µl de solución CTAB/NaCl, se realizó vortex para mezclar la solución con la muestra, se adicionaron 10 µl de RNasa y se incubó durante 1^o min a 65 °C.

Para ayudar a precipitar las macromoléculas se adiciono un volumen de cloroformo alcohol isoamílico (24:1) igual al de la muestra y se invirtió varias veces; posteriormente se centrifugo la muestra durante 5 min a 12000 RPM y se transfirió la fase acuosa a un tubo nuevo estéril de 1.7 ml.

Se agregó a la muestra un volumen igual de fenol-cloroformo-alcohol isoamílico, y se centrifugo a 12000 RPM durante 5 min.

Se transfirió el sobrenadante nuevamente a un tubo nuevo estéril, y se le añadió el 60 % de 2- propanol del volumen total para ayudar a precipitar los ácidos nucleicos. Se homogenizó y se dejó reposar por 24 h a -20 °C,

Pasado el tiempo, se centrifugó a 12000 RPM durante 20 min para pelletizar el ADN. Se lavó el precipitado con etanol al 70% y se volvió a centrifugar durante 5 min, esta operación se repitió dos

veces. Se retiró el sobrenadante y se procedió a secar completamente los tubos utilizando una vacufuga en función V-AL durante 15 min.

El precipitado obtenido fue resuspendido en 30 ul de agua y se conservó en refrigeración a -20 °C

Se evaluó la calidad y concentración de ADN obtenido mediante espectrofotometría, usando el NanoDrop (Thermo, Scientific NanoDrop 2000)

ADN de levaduras.

Para la extracción de ADN de levaduras se aplicó el protocolo interno del CIBE de “Extracción rápida de ADN genómico de hongos y levaduras”. [42]

Previo a la extracción del material genómico, se preparó el Buffer de extracción y se colocó 350 ul del buffer por muestra:

Los reactivos que conforman el Buffer de extracción se lo detalle a continuación. (Tabla 4)

TABLA 4
REACTIVOS QUE CONFORMAN EL BUFFER DE EXTRACCIÓN.

REACTIVOS	CONCENTRACIÓN
Tris-HCl pH 8,5	200Mm
NaCl	250mM
EDTA	25mM
SDS	0,5%

ELABORADO POR: MÓNICA PRADO

FUENTE: CIBE

Se utilizó pistilos plásticos estériles con los cuales se trituró el pellet de la muestra, este paso es crítico durante la extracción de ADN, pues permite el rompimiento de las paredes celulares para de esta manera libera el material genómico.

Se añadió 150 ul de Acetato de Sodio 3M, se homogenizó la muestra en vortex, y se colocó la muestra a una temperatura de -20°C durante 10 min. Luego de transcurrido el tiempo se centrifugó a una velocidad de 14000 RPM durante 5 min. Se transfirió el sobrenadante a nuevos tubos, este procedimiento se lo realizó 2 veces.

Finalizado este paso, se añadió 500 ul de Isopropanol en cada tubo, y se hizo vortex. Se dejaron reposar las muestras a

temperatura ambiente durante 5 min, y se centrifugó a toda velocidad (14000 RPM) durante 2 min.

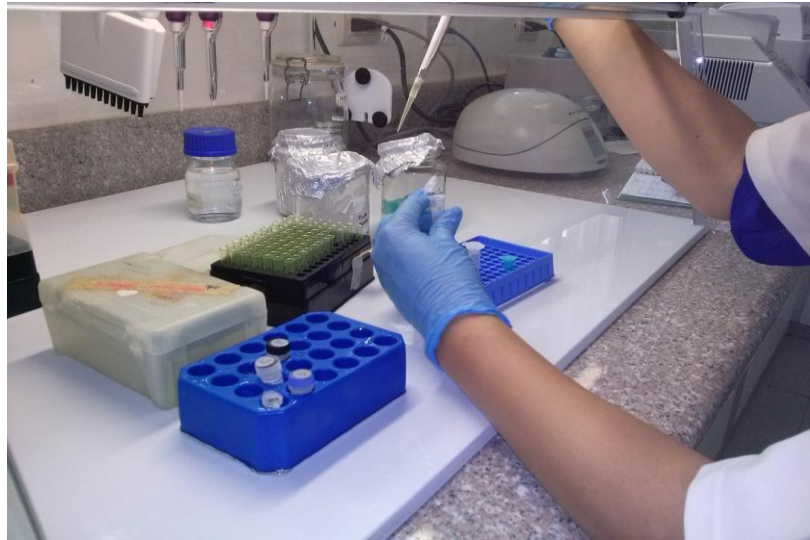
Se eliminó el sobrenadante evitando que el precipitado se pierda, se lavó el pellet con 50 µl de Etanol al 70%, se centrifugó las muestras durante 1 min, se eliminó el sobrenadante, y posterior se secaron los tubos utilizando una vacufuga.

El pellet obtenido fue resuspendido en 50 µl de agua estéril, y se conservó en congelación a -20°C.

PCR y Electroforesis

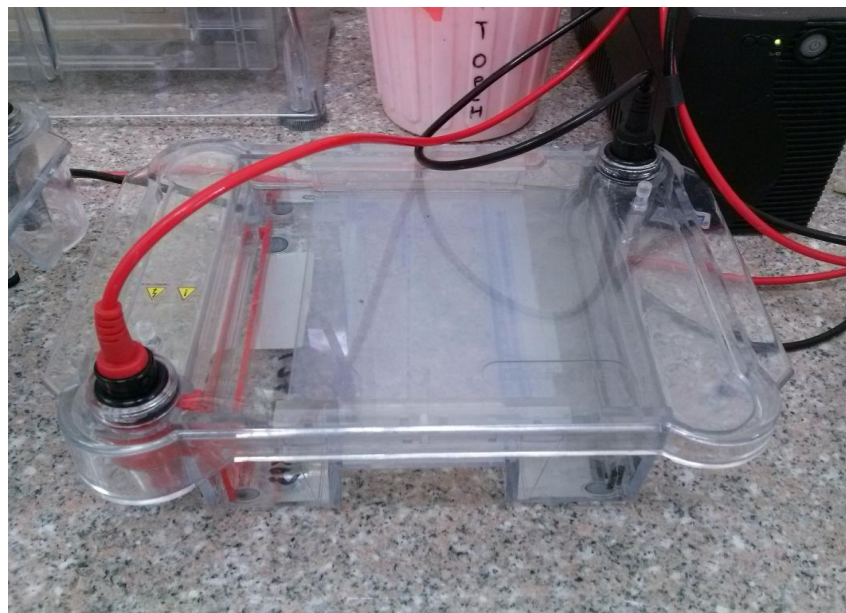
Previo a al inicio del proceso de PCR, se ajustaron las muestras de ADN en ~30ng/µl, esto se lo logró con la preparación de diluciones a partir del tempted de ADN.

La amplificación de ADN, bacteriano se realizó mediante las Reacción en Cadena de la Polimerasa en dos pasos (Nested-PCR), se utilizó una combinación de Primers universales bacterianos 27F y 1492R [43]. Estos Primers amplifica un fragmento del gen 16S rRNA de aproximadamente 1,5 kb. Y un par de Primers mas específicos 968F – 1378R que amplifica una región más específica de aproximadamente 420bp.



FUENTE: MÓNICA PRADO, CIBE

FIGURA 3.3 PROCEDIMIENTO DE PCR



FUENTE: MÓNICA PRADO, CIBE

FIGURA 3.4 ELECTROFORESIS

TABLA 5
DESCRIPCIÓN DE INICIADORES

SET DE INICIADORES	TAMAÑO (bp)
27F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3')	1500 bp
1492R (5-GGTTACCTTGTTACGACTT-3)	
968F (5'- GCACCATCTTCTTCAAGGACGAC -3')	410 bp
1378R (CGGTGTGTACAAGGCCCGGAACG)	

Elaborado Por: Mónica Prado

Fuente: Macalady (2006), Miyoshi (2005), Heuer And Smalla (1997)

TABLA 6
MASTER MIX PARA PCR- PRIMERS 27F – 1492R

REACTIVO	CONCENTRACIÓN INICIAL TÍPICA	CONCENTRACIÓN FINAL	VOLUMEN EN μL (REACCIÓN DE 10 μL)
PCR buffer	10 X	1 X	1
MgCl ₂	50 Mm	5 mM	1
Primer Forward	10 μM	0.4 μM	0.4
Primer Reverse	10 μM	0.4 μM	0.4
DNTPs	10 mM	400 μM	0.4
Taq	5 U/ μl	0.4 U	0.08
ADN	~30ng/ μl	~15 ng	0.5
Agua	-	-	Enrasar a 10 μl (6.22)

Elaborado Por: Mónica Prado

FUENTE: CIBE

TABLA 7
MASTER MIX PARA PCR- PRIMERS 968F – 1378R

REACTIVO	CONCENTRACIÓN INICIAL TÍPICA	CONCENTRACIÓN FINAL	VOLUMEN EN μL (REACCIÓN DE 10 μL)
PCR buffer	10 X	1 X	1
MgCl ₂	50 mM	3 mM	0,6
Primer Forward	10 μM	0.3 μM	0.4
Primer Reverse	10 μM	0.3 μM	0.3
DNTPs	10 mM	400 μM	0.3
Taq	5 U/ μl	0.4 U	0.04
ADN	-	-	0.5
Agua	-	-	Enrasar a 10 μl (6.86)

Elaborado Por: Mónica Prado

FUENTE: CIBE

El Máster Mix fue preparado utilizando puntas estériles, se adicionó el PCR Buffer, MgCl₂, Primers Forward y Reverse, dNTPs, Taq, según las cantidades correspondiente a los pares de Primers utilizados, el resto se lo completó con agua estéril hasta llegar a un volumen de 9 μl , Todo esto se multiplicó por el número de muestras totales que se tuvo en cada corrida, más 1 muestra de control.

Componentes de la PCR.

- ADN: a partir del cual se quiere obtener una copia del fragmento, este se conoce como ADN molde.
- ADN polimerasa: se utiliza la Taq polimerasa, una enzima termoestable que cataliza la polimerización de los nucleótidos en la dirección 5'-a-3' a 70-74 °C y exhibe una vida media de 30-45 minutos a 95 °C. Esta enzima es una ADN polimerasa de tipo I. La enzima es capaz de amplificar productos de hasta 5 kb de longitud.
- Primers o cebadores: son Oligonucleótidos generalmente cortos de alrededor de 20 bases de longitud, necesarios para que la ADN polimerasa le añada nucleótidos por el extremo 3' OH. (HAYS Y COL., 2008). El tamaño de elección del primer dependerá del tamaño del ADN molde. (KOOLMAN Y COL., 2005).
- Desoxiribonucleosidos trifosfatos (dNTPs): dATP, dCTP, dTTP, dGTP, la concentración de cada uno de los dNTPs para la PCR debe estar entre 20 y 200 µM- (INNIS ET AL., 1988)
- Tampones de reacción y MgCl₂ en la PCR.

La técnica de PCR, además de los reactivos que intervienen directamente en la reacción, también necesita un tampón, el cual dependerá del tipo y características de la enzima utilizada.

Entre los tampones más utilizados se encuentran:

- TRIS 10 mM, pH 8,3
- KCl 50 Mm
- MgCl₂ 1,5-2,5 mM.

Los iones de magnesio actúan como cofactor para la ADN polimerasa, su concentración en la mezcla final de reacción suele encontrarse entre 0,5 y 50 mM, mientras mayor ion Mg habrá mayor amplificación, pero un exceso también podría provocar amplificaciones inespecíficas. Los iones de Mg⁺² cumplen las siguientes funciones:

- Forman un complejo soluble con los dNTPs, lo cual es fundamental para la incorporación de estos;
- Estimulan la actividad polimerásica;
- Aumentan la Tf de la interacción cebador / ADN molde (con lo que estabilizan la interacción entre las dos cadenas).
- Agua: medio necesario para la formación de puentes de hidrógenos que se forman entre las bases nitrogenadas.

Posterior a la preparación del Máster Mix se colocaron 9 µl de este en cada tubo Eppendorf y 1 µl de ADN de cada muestra. Y se procedió a rotular cada muestra y el blanco.

Se homogenizó la muestra mediante vortex, antes de ser colocado en el termociclador para la amplificación.

Los tubos Eppendorf preparados, se ingresaron en el termociclador y se lo programó de acuerdo a cada pareja de Primers utilizados.

TABLA 8
PROGRAMA PARA REALIZAR PCR USANDO LOS PRIMERS
27F Y 1492R

Proceso	Temperatura	Tiempo (min)	
Desnaturalización inicial	96 °C	5	
Desnaturalización	96 °C	1	Se repite el ciclo 35 Ciclos
Hibridación	55 °C	1	
Extensión	72 °C	1	
Extensión final	72 °C	3	
Mantenimiento	4 °C	∞	

Elaborado Por: Mónica Prado

FUENTE: CIBE

TABLA 9
PROGRAMA PARA REALIZAR PCR USANDO LOS PRIMERS 968F
1378R

Proceso	Temperatura (°C)	Tiempo (min)	
Desnaturalización inicial	96	5	
Desnaturalización	96	1	Se repite el ciclo 35 Ciclos
Hibridación	57	1	
Extensión	72	1.5	
Extensión final	72	10	
Mantenimiento	4	∞	

Elaborado Por: Mónica Prado

FUENTE: CIBE

Mientras se realizaba la amplificación en el termociclador, se preparó el gel de agarosa al 2%, se pesó 1,6 gr de agarosa en 100 ml de tris-acetato-EDTA (TAE 1X) para lograr una concentración del 2%. Posteriormente se calentó en el microondas hasta que se disolvió, la solución debe presentar una transparencia total sin formación de burbujas.

Luego que la solución de agarosa se enfrió, se adicionó 10 µl de SYBR Safe (10.000x, Invitrogen), es importante que la adición de este reactivo sea lo realice lo menos expuesto a la luz, debido a que es fotosensible. El SYBR Safe es un reactivo fluorescente el cual se intercala entre los pares de bases del ácido nucleído.

Luego de añadir el reactivo en la solución de agarosa, se lo colocó en el molde, el cual debe estar perfectamente nivelado.

Finalizado el programa del termociclador, se colocó el gel de agarosa en la cámara electroforética conteniendo el tampón TAE 1X para llevar a cabo el proceso de electroforesis. Los pocillos del gel fueron llenados con un volumen total de 6 μ l (5 μ l producto de la PCR y 1 μ l Loading DYE). El Loading Dye es un colorante que se utiliza para preparar los marcadores de ADN y las muestras para la carga en geles de agarosa.

Se utilizó un marcador de ADN (100 pb Ladder Invitrogen) para determinar el tamaño de los amplicones.

Se encendió la cámara de electroforesis a un voltaje de 120 voltios, una intensidad de 400 amperios durante 30 minutos.

Transcurrido este tiempo, el gel es colocado en un transiluminador (Bio-Rad, Gel DocTM XR) donde se puede visualizar las bandas de ADN amplificado.

Secuenciación

Las muestras aisladas de los 4 días de fermentación de los granos de cacao fueron enviadas al Instituto de “Investigaciones de Cáncer y Genética de la Universidad de Florida” para su secuenciación mediante el método Sanger.

La secuencia obtenida se analizó con bases de secuencias disponibles en la web, por medio del programa BLAST (Basic Local Alignment Tool; <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>) para determinar el nivel de correspondencia con secuencias previamente publicadas en el Gen Bank e identificar las especies a las que pertenecen.

Enzima de restricción

Para aquellas muestras de las que no se obtuvo un patrón de secuencia conocido, se procedió a realizar su identificación mediante el uso de la enzima HindIII. Dichas muestras fueron comparadas con los microorganismos ya identificados que se presentan en la tabla siguiente.

TABLA 10
MUESTRAS IDENTIFICADAS MEDIANTE EL USO DE ENZIMAS DE
RESTRICCIÓN

MUESTRA	MICROORGANISMOS IDENTIFICADOS
1B	<i>Valores menores a 90%</i>
1A	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
2	<i>Lactobacillus nagelii</i>
7	<i>Acetobacter pasteurianus</i>
30	<i>Valores menores a 90%</i>
33	<i>acetobacter ghanensis</i>
35	<i>Valores menores al 90%</i>
39	<i>Valores menores al 90%</i>

Elaborado Por: Sulay Zambrano

La preparación del máster mix es similar al que se realizó para la PCR, con las condiciones descritas a continuación:

TABLA 11
MIX DE LA ENZIMA DE RESTRICCIÓN HINDIII

HindIII	1 ul
10X Buffer M	2 ul
Substrate DNA	≤ 1 ug
Sterile Water	up to 20 uL

Elaborado Por: Sulay Zambrano

FUENTE: INVITROGEN, 2014

Así mismo, se utilizaron puntas estériles, cámara libre de ADN y tubos Falcón de 200 ul previamente esterilizados.

Una vez mezclado todo se llevo al termociclador a incubar a temperatura de 37°C por una hora. A la par se preparó un gel de agarosa al 3%; para esto se utilizaron 30 ml de solución TAE al 1X (Tris-acetato-EDTA) y 0.9 g de Agarosa, se llevo a calentamiento hasta obtener una mezcla homogénea y transparente, finalmente se le adicionó 3 ul de SYBR Safe (10.000x, Invitrogen) y se dejó reposar en una cama para electroforesis protegido de la luz hasta que este consistente.

Una vez concluida la reacción con la enzima se procedió a poner las muestras en la cama ya colocada en la cámara electroforética

tal cual se lo realiza para PCR. Se deja correr el gel por un tiempo de 20 minutos a 100 voltios y 400 amperios, una vez concluido el tiempo de electroforesis se lleva a revelar el gel en el transiluminador donde se podrá observar de acuerdo a la cantidad de cortes situados en sitios específicos de la enzima si tienen parecido a las muestras ya conocidas.

Cabe recalcar que todo el procedimiento se llevó a cabo en gradillas refrigeradas, ya que la enzima puede degradarse a temperaturas mayores de 20°C.

3.2. Fermentación

Pruebas de esterilización de los granos de cacao.

Antes de comenzar el proceso de fermentación, se realizaron 2 pruebas para establecer el método de esterilización que se usaría para eliminar los microorganismos presentes en el grano de cacao durante los 4 días de fermentación.

La primera prueba consistió en colocar 5 gr de granos de cacao, triturados en nitrógeno líquido, durante 3 horas bajo luz Ultravioleta a una distancia de 5cm de la lámpara de rayos UV. El cacao triturado fue esparcido en porciones de 1 gramo en bandejas cubiertas con papel aluminio, para obtener una mayor penetración de la luz UV a toda su superficie. Cada hora se tomaba una

muestra de 1 gr del grano triturado y se lo suspendía en un tubo Falcón que contenía 9 ml de PDB, se agitaba el tubo durante 2 minutos, moviendo los brazos en un ángulo de 45 grados (FDA), y se colocaban 100 ul de la suspensión en una caja Petri con PDA. Las cajas Petri se incubaron a una temperatura de 35 °C durante 2 días, luego de este tiempo, se verificó si existió crecimiento microbiano o no.

El segundo método utilizado consistió en la esterilización del grano de cacao triturado mediante nitrógeno líquido, mediante vapor con la ayuda de un autoclave Sterilmatic , durante 20 minutos.



Fuente: Mónica Prado, Cibe

**FIGURA 3.5 GRANO DE CACAO TRITURADO CON
NITRÓGENO LÍQUIDO.**

La muestra de cacao (1gr) fue colocado en un tubo Falcón de 50ml esterilizado previamente, se lo autoclavó a una temperatura de 121 °C durante 20 minutos, La muestra se suspendió en 9 ml de PDB, se agitó durante 2 minutos, moviendo los brazos con un ángulo de 45 grados, y se transfirieron 100 ul del medio con la muestra en una caja Petri con PDA. Se incubaron las placas durante 2 días, a una temperatura de 35°C y se analizaron los resultados, observando si hubo o no crecimiento de colonias.

Luego de realizar este tipo de pruebas, se procedió a iniciar los análisis de compuestos de aromas con cada uno de los métodos usados para la esterilización de los granos, a fin de determinar el impacto de la esterilización en el aroma del grano de cacao.

Se analizaron tres muestras con la ayuda de cromatografía usando el método de Microextracción en Fase Sólida (SPME), la primera muestra correspondía a 5 gramos de cacao triturados y sin esterilizar, las segunda muestra eran 5 gramos de cacao esterilizados con vapor usando el autoclave, y la última muestra analizada fueron 5 gramos de cacao triturado expuestos a Luz UV durante dos horas.

Con las gráficas obtenidas posterior análisis de los compuestos y sus concentraciones en cada una de las muestras, se logró establecer que el mejor método para la esterilización.

Fermentación.

Los experimentos de fermentación se realizaron a nivel de laboratorio, en condiciones controladas las más cercanas posibles a las que se dan durante la fermentación realizada en el campo.

La fermentación fue realizada para cada uno de los días que dura este proceso, se obtuvo un total de 5 días, empezando en el día 0 hasta el cuarto día.

La colección de aislados obtenida según lo descrito en la sección 3.1 fue utilizada para realizar las pruebas de fermentación.

Cada microorganismo de la colección fue inoculado en 10 ml del medio de cultivo PDB e incubado a 35 °C por 5 días.

Los inóculos fueron luego fueron centrifugados durante media hora, a 5000 rpm a temperatura ambiente, luego se eliminó el sobrenadante, y el pellet se resuspendió en 10 ml de agua estéril ultra pura, para su posterior centrifugado a 5000 rpm por media hora. Este paso de lavado se realizó 3 veces, con el fin de asegurarse que no haya restos de PDB que puedan interferir en el proceso de fermentación y generación de compuestos. Finalizado

el tercer lavado, el inóculo se preparó a una concentración de 0,5 Mc Farland, con la ayuda de un espectrofotómetro Densimat. Luego, se procedió a colocar 5 gramos del grano estéril en tubos Falcón de 50ml, y fueron inoculados con los respectivos microorganismos previamente lavados.



FUENTE: MÓNICA PRADO, CIBE

FIGURA 3.6 INOCULACIÓN DE LOS MICROORGANISMOS EN EL GRANO ESTÉRIL

De cada inoculación se realizaron 6 réplicas en total, 3 cuyas condiciones de crecimiento fueron aerobias, y 3 en condiciones anaerobias. Así mismo se realizaron de 6 controles, 3 los cuales

contenían 5 gramos de grano esterilizado, y 3 con muestra sin esterilizar.



FUENTE: MÓNICA PRADO, CIBE

FIGURA 3.7 GRANO DE CACAO INOCULADO

Luego que se realizó la inoculación, los tubos fueron incubados de acuerdo a las condiciones utilizadas para el crecimiento del inóculo. Así, los microorganismos cuyo crecimiento se dio en condiciones aerobias fueron incubados en condiciones aerobias a la temperatura de referencia por día de fermentación que indica la tabla 12. Y los tubos cuyos microorganismos inoculados crecieron en condiciones anaerobias, fueron colocados en una cámara de

anaerobiosis, e incubados a las temperaturas indicadas en la Tabla 12.

TABLA 12
TEMPERATURAS DE FERMENTACIÓN DE GRANOS DE CACAO.

DÍAS DE FERMENTACION	TEMPERATURA °C
0	31,02
1	19,99
2	41,22
3	33,99
4	33,98

Elaborado Por: Mónica Prado

El periodo de incubación fue de 24 horas, pasado este tiempo, los tubos fueron sellados con rolopac para evitar cualquier tipo de contaminación, y almacenados a -80°C hasta que fueron analizados.

3.3. Identificación de Compuestos de aroma.

La muestra contenida en los tubos Falcón de 50ml fueron pasados a viales para poder realizar el análisis en el cromatógrafo de gases acoplado a un espectrómetro de masas (GC-MS).

Cada vial fue colocado en baño maría a una temperatura de 55°C por 30 minutos, pasado ese tiempo se colocó una microfibra DVB/CAR/PDMS en el tubo por 30 minutos más. Luego la microfibra fue inyectada en el cromatógrafo GC-MS y al cabo de 5 minutos se retiró la microfibra y se procedió a inyectar en el GC-MS.



Fuente: Mónica Prado, Cibe

FIGURA 3.8 1. MICROFIBRA INYECTADA EN EL VIAL CON MUESTRA. 2. MICROFIBRA INYECTADA EN EL CROMATÓGRAFO.

El programa tiene una corrida de aproximadamente 34 minutos por cada muestra con las siguientes condiciones: el inyector estaba a 70 °C, la estufa inició a 70 °C por 0,5 min y llegó a 325 °C a una tasa de 25 °C/min, la detección se realizó en el espectrómetro de masas en modo total y los compuestos fueron identificados

utilizando las librerías Wiley y Nist. Una vez finalizado el análisis, el programa da como resultado una gráfica de curvas y picos que corresponden a los diferentes compuestos que fueron detectados durante la corrida.



FUENTE: MÓNICA PRADO, CIBE

FIGURA 3.9 CROMATÓGRAFO DE GASES ACOPLADO A UN ESPECTRÓMETRO DE MASAS (GC-MS).

3.4. Análisis estadístico.

Mediante la estadística se pudo establecer la existencia de una diferencia significativa en la generación de compuestos aromáticos

para cada uno de los microorganismos aislados en los días de fermentación analizados.

Se aplicó el análisis de varianza de un solo factor con un nivel de confianza del 95%.

CAPÍTULO 4

4. ANÁLISIS DE RESULTADOS

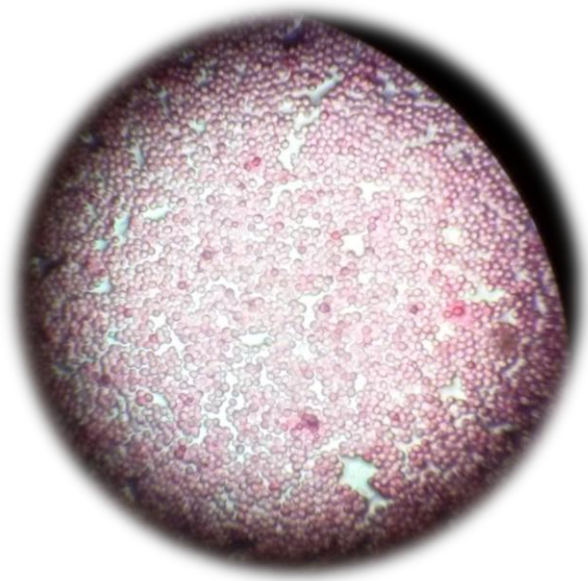
Aislamiento

Transcurrido los 5 días de incubación, los microorganismos que fueron aislados según su morfología en la placa de PDA, fueron observados con ayuda del microscopio para asegurarse de que no exista contaminación. Estos clasificados en bacterias y levaduras según la forma y tamaño que presentaban en la observación con el microscopio. En total se aislaron 50 bacterias y 20 levaduras.

Las bacterias presentaron dos formas predominantes: cocos y bacilos.

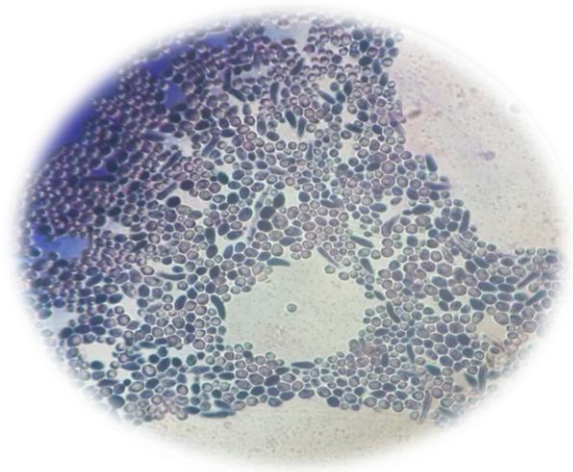
(Figura 4.1)

Las levaduras presentaron forma ovoide, con una morfología similar a las bacterias, sólo que un poco más grande, así mismo, la tinción fue más oscura que la de las bacterias. (Figura 4.2)



**FIGURA 4.1 BACTERIA GRAM-NEGATIVA OBSERVADA
BAJO EL LENTE DEL MICROSCOPIO.**

FUENTE: MÓNICA PRADO, CIBE



**FIGURA 4.2 LEVADURA NO IDENTIFICADA OBSERVADA
BAJO EL LENTE DEL MICROSCOPIO.**

FUENTE: MÓNICA PRADO, CIBE

Extracción de ADN

Las concentraciones de ADN genómico variaron desde 30 ng/μl a 2300 ng/μl en un volumen final de 30 μl.

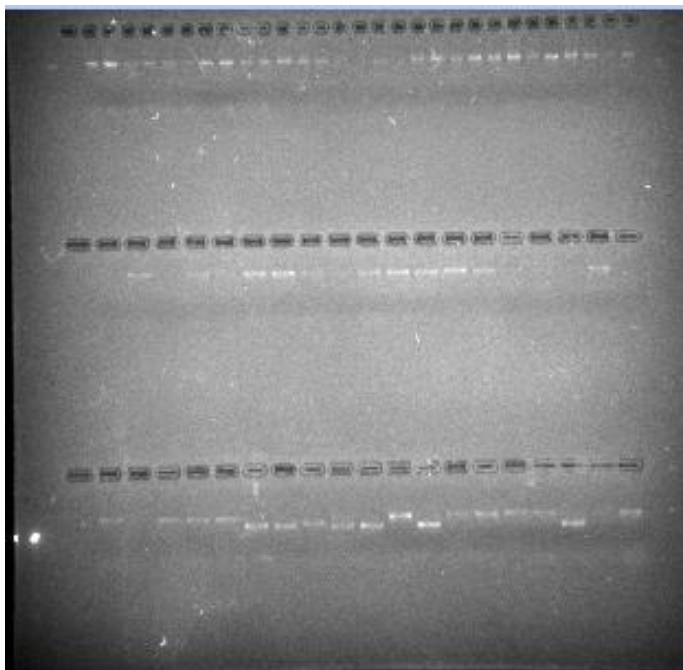


FIGURA 4.3 ANÁLISIS DE ELECTROFORESIS DE LA PRESENCIA DE ADN TOTAL EN UN GRUPO DE LAS MUESTRAS AISLADAS.

FUENTE: MÓNICA PRADO, CIBE

Secuenciación.

Las secuencias del gen 16s de bacterias y de la región ITS de levaduras fueron sometidas a BLAST del NCBI. Los resultados obtenidos (primer match del análisis BLAST) en la secuenciación de los aislados se muestran en las Tablas 13-16.

TABLA 13

MICROORGANISMOS IDENTIFICADOS DÍA 1 DE FERMENTACIÓN

MUESTRA	MICROORGANISMOS IDENTIFICADOS
1B	Valores menores a 90%
1 ^a	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
2	<i>Lactobacillus nagelii</i>
4C	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
7	<i>Acetobacter pasteurianus</i>
9	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
10	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
16	<i>Lactobacillus nagelii</i>
17	<i>Lactobacillus nagelii</i>
20 ^a	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
24	<i>Lactobacillus nagelii</i>
25	<i>Lactobacillus nagelii</i>
26	<i>Lactobacillus nagelii</i>
30	Valores menores a 90%
33	<i>Acetobacter ghanensis</i>
35	Valores menores al 90%
36	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
38	<i>Lactobacillus nagelii</i>
39	Valores menores al 90%
40	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
41	<i>Lactobacillus nagelii</i>
48	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
55	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
56	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>

Elaborado por: Mónica Prado

TABLA 14

MICROORGANISMOS IDENTIFICADOS DÍA 2 DE FERMENTACIÓN

MUESTRA	MICROORGANISMOS IDENTIFICADOS
1 ^a	<i>Acetobacter ghanensis</i>
3	<i>Saccharomyces cervicae</i>
5	<i>Acetobacter ghanensis</i>
6	<i>Acetobacter ghanensis</i>
7	<i>Acetobacter ghanensis</i>
8	<i>Lactobacillus fermentum</i>
9 ^a	Valores menores al 90%
12B	<i>Acetobacter ghanensis</i>
15 ^a	<i>Acetobacter syzygii</i>
16B	<i>Acetobacter ghanensis</i>
17B	<i>Acetobacter ghanensis</i>
18 ^a	<i>Acetobacter ghanensis</i>
20	<i>Candida metapsilosis</i>
20B	<i>Acetobacter ghanensis</i>
21	<i>Saccharomyces cervicae</i>
24 ^a	<i>Acetobacter ghanensis</i>
24B	<i>Acetobacter ghanensis</i>
26 ^a	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>
26B	<i>Acetobacter ghanensis</i>

Elaborado por: Mónica Prado

TABLA 15

MICROORGANISMOS IDENTIFICADOS DÍA 3 DE FERMENTACIÓN

MUESTRA	MICROORGANISMOS IDENTIFICADOS
6	<i>Acetobacter ghanensis</i>
7	<i>Lactobacillus nagelii</i>
8	<i>Lactobacillus nagelii</i>
9	Valores menores al 90%
10	<i>Lactobacillus nagelii</i>
12	<i>Lactobacillus nagelii</i>
13	<i>Acetobacter ghanensis</i>
14	<i>Lactobacillus nagelii</i>
15	<i>Lactobacillus nagelii</i>
16	<i>Acetobacter ghanensis</i>
17	<i>Lactobacillus fermentum</i>
18	<i>Lactobacillus fermentum</i>

Elaborado por: Mónica Prado

TABLA 16

MICROORGANISMOS IDENTIFICADOS DÍA 4 DE FERMENTACIÓN

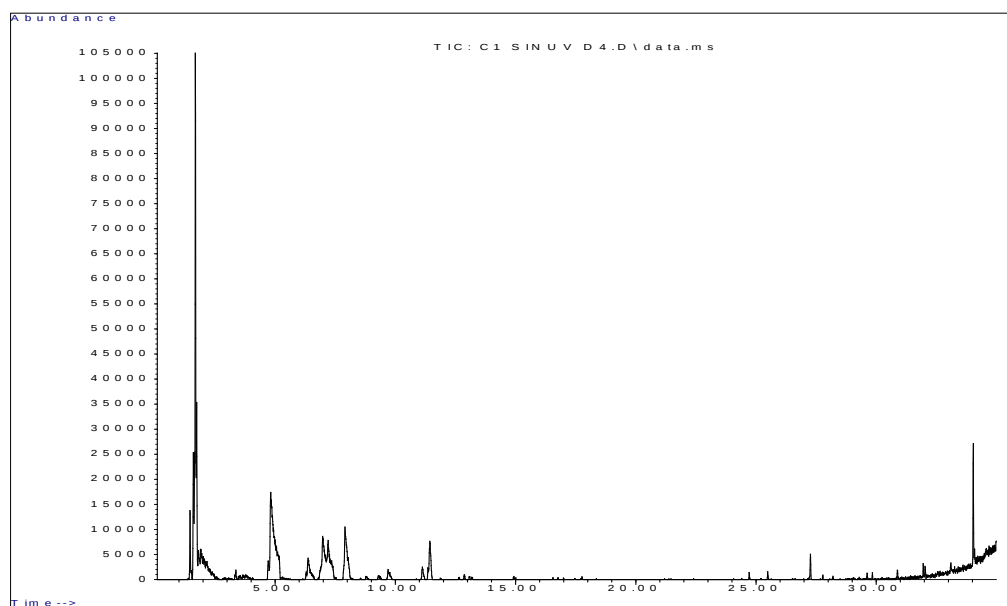
MUESTRA	MICROORGANISMO IDENTIFICADO
4b	<i>Candida metapsilosis</i>
9	<i>Acetobacter pasteurianus</i>
14b	<i>Acetobacter ghanensis</i>
15b	<i>Acetobacter ghanensis</i>
18c	<i>Bacillus subtilis</i>
28b	<i>Bacillus subtilis</i>
29b	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>
36	<i>Bacillus subtilis</i>
37	<i>Candida metapsilosis</i>
44c	<i>Candida metapsilosis</i>
45	<i>Acetobacter pasteurianus</i>

Elaborado por: Mónica Prado

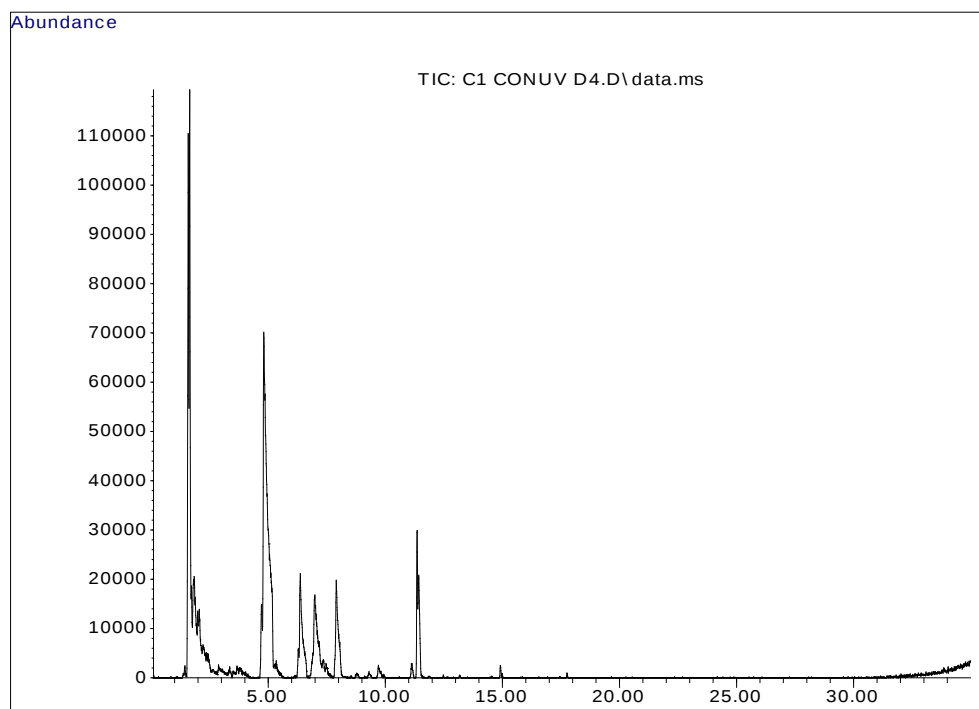
Pruebas de esterilización de los granos de cacao.

Se comparo esterilización por calor a 121°C por 15 min y esterilización UV, para escoger el método más adecuado y en el cual existiera un menor porcentaje de pérdidas de compuestos de aroma.

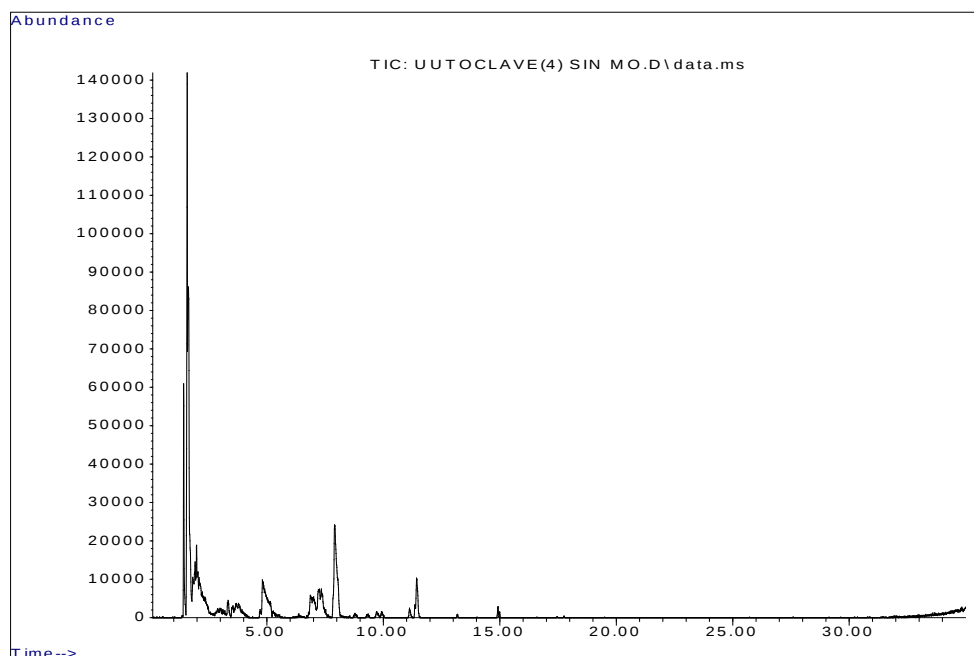
En las gráficas obtenidas del GC-MS, utilizando los dos métodos de esterilización expuestos anteriormente, se observa que no existe la desaparición total de compuestos aromáticos del grano de cacao utilizando la Luz UV o el autoclave, por lo cual se analizó la concentración de los compuestos y determinar pérdidas en los mismos.



Fuente: Cromatógrafo Gc-Ms
**FIGURA 4.4 CROMATOGRAMA, GRANOS DE CACAO SIN
ESTERILIZAR**



Fuente: Cromatógrafo Gc-Ms
**FIGURA 4.5 CROMATOGRAMA, GRANOS DE CACAO
ESTERILIZADO USANDO LUZ UV**



**FIGURA 4.6 CROMATOGRAMA, GRANOS DE CACAO
ESTERILIZADO USANDO VAPOR MEDIANTE UN AUTOCLAVE.**

Fuente: Cromatógrafo Gc-Ms

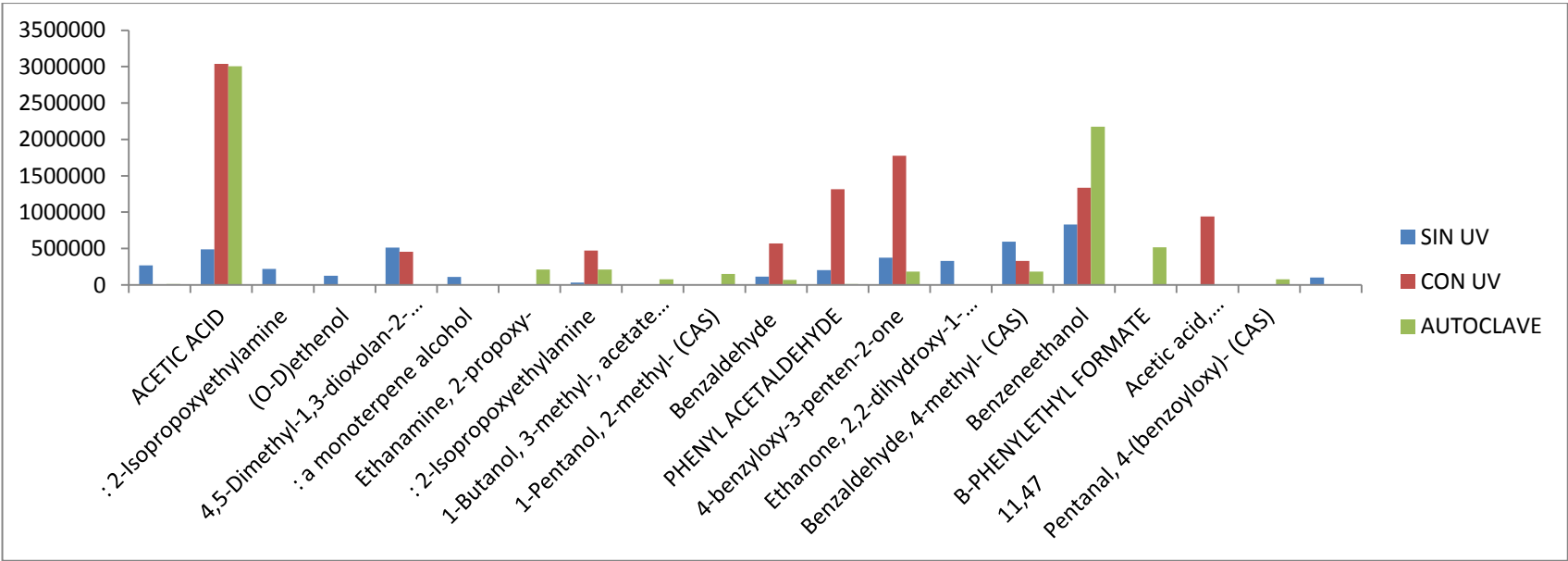
Se realizó un análisis estadístico para poder observar las diferencias significativas que existían en las concentraciones de los compuestos obteniendo como resultado un Diagrama de barras (Tabla 13) donde se observa que utilizando el método de esterilización con Luz UV no existe pérdida de los compuestos de aromas.

En El ANEXO C se puede observar varios compuestos encontrados durante los análisis cromatográficos realizados, se tomaron 3 datos de

cada una de las gráficas obtenidas, tiempo, nombre del compuesto y área (concentración).

TABLA 17

COMPARACIÓN DE LAS CONCENTRACIONES DE COMPUESTOS DE AROMAS EN GRANOS DE CACAO CON DIFERENTES MÉTODOS DE ESTERILIZACIÓN.



ELABORADO POR: MÓNICA PRADO

Microextracción en Fase Sólida (SPME)

Dentro del análisis de compuestos aromáticos en las tablas del ANEXO E se puede observar la comparación entre la concentración de los compuestos identificados de los controles y las réplicas con inóculo. Observando aquellos compuestos que se consumen, se producen aumentando su concentración o aquellos que no varían.

Análisis de varianza de un solo factor (ANOVA)

Para analizar los resultados de la producción o consumo de compuestos de aroma específicos por parte de los microorganismos aislados durante la experimentación de los cuatro primeros días de fermentación del cacao, se aplicó el análisis de varianza de un solo factor con un nivel de confianza del 95%.

Con un valor p menor a 0,05 se puede decir que existe la suficiente evidencia estadística para no rechazar la hipótesis establecida en el trabajo de investigación la cual indica que existen géneros y especies de microorganismos específicos que intervienen en el proceso de fermentación y que son responsables de la generación del aroma de los granos de cacao. En las tablas del ANEXO F siguientes se puede observar los resultados del análisis ANOVA.

En las siguientes tablas se puede observar los compuestos aromáticos cuyo análisis ANOVA, dieron un valor $p < 0,05$, indicando su relación con la concentración hallada en los controles correspondientes de cada día de fermentación. Y el perfil aromático que cada uno de estos compuestos posee.

TABLA 18

COMPUESTOS AROMÁTICOS CON VALOR P < A 0,05 DURANTE EL DIA 0 DE FERMENTACIÓN

<i>Lactobacillus nagelii</i>			
COMPUESTO	RESULTADO	RELACION I/C	PERFIL AROMÁTICO
AEROBIAS			
Ethanol	0,003502307	0,2	Alcohólico
Benzaldehyde	0,030937574	0,2	Almendras
1-[2-(2-Methylbutyl)phenyl]ethanone	0,038995084	0,2	Rosas
2,3-Butanediol	0,013364763	3,4	Mantequilla
Benzeneethanol	0,01310778	5,3	miel, especias, rosa, lila, flores, caramelo
ANAEROBIAS			
Benzeneethanol	0,042866443	3,1	miel, especias, rosa, lila, flores, caramelo
(3R)-3-Phenyl-2,3-dihydro-1H-isoindol	0,030190465	3,6	Frutal
9-propylphenanthrene	0,000188278	13,7	olor aromático débil
Acetophenone	0,005621655	1,5	Floral
Ethanol	0,00073259	0,1	Alcohólico
Benzaldehyde	0,017583358	0,1	Almendras
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>			

COMPUESTO	RESULTADO	RELACION I/C	PERFIL AROMÁTICO
AEROBIAS			
benzyl 2,2'-di-O-methyldivaricatate	0,011388673	2,6	Floral
Benzeneethanol	0,010198238	4,7	miel, especias, rosa, lila, flores, caramelo
ANAEROBIAS			
Benzaldehyde	0,00425235	0,11	Almendras
<i>Acetobacter pasteurianus</i>			
COMPUESTO	RESULTADO	RELACION I/C	PERFIL AROMÁTICO
AEROBIAS			
Acetic acid	0,014796227	21,3	Nuez
Benzeneethanol	0,039385778	11,9	miel, especias, rosa, lila, flores, caramelo
Acetaldehyde	0,00706142	0,4	Frutal
Butanal, 3-methyl-	0,03846021	0,9	Dulce
Benzaldehyde	0,012856298	0,2	Almendras
ANAEROBIAS			
Benzaldehyde	0,002439835	0,1	Almendras
FUENTE: PERFIL AROMÁTICO: COMMON FRAGRANCE AND FLAVOR MATERIALS, 2006 [44]			

ELABORADO POR: MÓNICA PRADO

TABLA 19

COMPUESTOS AROMÁTICOS CON VALOR P < A 0,05 DURANTE EL DIA 1 DE FERMENTACIÓN

<i>Lactobacillus nagelii</i>			
COMPUESTO	RESULTADO	RELACION I/C	PERFIL AROMÁTICO
ANAEROBIAS			
Benzeneethanol	0,037962152	2	miel, especias, rosa, lila, flores, caramelo
<i>Acetobacter pasteurianus</i>			
COMPUESTO	RESULTADO	RELACION I/C	PERFIL AROMÁTICO
AEROBIAS			
Acetophenone	0,007721099	0,4	Floral
Acetaldehyde	0,02552192	0,3	Frutal
ANAEROBIAS			
Butyraldehyde	0,045490892	0,6	Chocolate
Benzaldehyde	0,006218331	0,1	Almendras
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>			
COMPUESTO	RESULTADO	RELACION I/C	PERFIL AROMÁTICO
AEROBIAS			
2,3-Butanediol	0,027670812	1,1	mantequilla cremosa con sabor a fruta
ANAEROBIAS			
2-Propyldecan-1-ol	0,046530046	2,0	Floral
FUENTE: PERFIL AROMÁTICO: COMMON FRAGRANCE AND FLAVOR MATERIALS, 2006			

ELABORADO POR: MÓNICA PRADO

TABLA 20

COMPUESTOS AROMÁTICOS CON VALOR P < A 0,05 DURANTE EL DIA 2 DE FERMENTACIÓN

<i>Cándida metapsilosis</i>			
COMPUESTO	RESULTADO	RELACION I/C	PERFIL AROMÁTICO
AEROBIAS			
Benzaldehyde (CAS)	0,01070911	0,17	Almendras
Butanoic acid (CAS)	0,00795566	0,11	olor desagradable
ANAEROBIAS			
2-Butanone, 3-hydroxy-	0,089405873	0,66	
Butanal, 3-methyl- (CAS)	0,017753676	0,35	olor desagradable

<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>			
COMPUESTO	RESULTADO	RELACION I/C	PERFIL AROMÁTICO
AEROBIAS			
Benzaldehyde (CAS)	0,006421004	0,40	Almendras
ANAEROBIAS			
Benzaldehyde (CAS)	0,008120906	0,27	Almendras

PHENYL ACETALDEHYDE	0,00162226	>1	Dulce a caramelo, rosas,
---------------------	------------	----	--------------------------

<i>Saccharomyce cerevisaes</i>			
COMPUESTO	RESULTADO	RELACION I/C	PERFIL AROMÁTICO
AEROBIAS			
Benzaldehyde (CAS)	0,046429502	0,39	Almendras
<i>Acetobacter syzygii</i>			
COMPUESTO	RESULTADO	RELACION I/C	PERFIL AROMÁTICO
AEROBIAS			
Benzaldehyde (CAS)	0,024149879	0,53	Almendras
ANAEROBIAS			
Benzaldehyde (CAS)	0,005606151	0,24	Almendras
<i>Lactobacillius fermentum</i>			
COMPUESTO	RESULTADO	RELACION I/C	PERFIL AROMÁTICO
ANAEROBIAS			
Butanal, 3-methyl- (CAS)	0,015508913	>1	olor desagradable
Acetaldehyde (CAS)	0,024004922	>1	Cítrico, como manzanas verdes

FUENTE: PERFIL AROMÁTICO: COMMON FRAGRANCE AND FLAVOR MATERIALS, 2006

ELABORADO POR: SULAY ZAMBRANO

TABLA 21

COMPUESTOS AROMÁTICOS CON VALOR P < A 0,05 DURANTE EL DIA 3 DE FERMENTACIÓN

<i>Acetobacter ghanensis</i>			
COMPUESTO	RESULTADO	RELACION I/C	PERFIL AROMÁTICO
AEROBIAS			
Benzeneethanol (CAS)	0,041955306	0,29	Dulce, a rosas
Decanoic acid, ethyl ester (CAS)	0,033733173	>1	Dulce crema de mantequilla
Acetic acid, ethyl ester (CAS)	0,001919571	0,07	Olor dulce, similar a peras
ANAEROBIAS			
Acetic acid, ethyl ester (CAS)	0,001007076	0,036	Olor dulce, similar a peras
1-Butanol, 3-methyl- (impure)	0,005848035	0,15	olor desagradable
Benzeneethanol (CAS)	0,015117045	0,052	Dulce, a rosas
<i>Lactobacillus fermentum</i>			
COMPUESTO	RESULTADO	RELACION I/C	PERFIL AROMÁTICO
AEROBIAS			
1-Butanol, 3-methyl- (impure) (CAS)	0,009666463	0,20	olor desagradable
Decanoic acid, ethyl ester (CAS)	0,03370116	>1	Dulce crema de mantequilla
ANAEROBIAS			
Ethanol, 2-nitro- (CAS)	0,097294776	0,24	Alcohólico
Acetic acid, ethyl ester (CAS)	0,00179853	0,06	Olor dulce, similar a peras

1-Butanol, 3-methyl- (impure) (CAS)	0,045799617	0,44	olor desagradable
Decanoic acid, ethyl ester (CAS)	0,000540686	>1	Dulce crema de mantequilla
<i>Lactobacillus nagelii</i>			
COMPUESTO	RESULTADO	RELACION I/C	PERFIL AROMÁTICO
AEROBIAS			
Acetic acid, ethyl ester (CAS)	0,003506942	0,10	Olor dulce, similar a peras
<i>Saccharomyce cerevisaes</i>			
COMPUESTO	RESULTADO	RELACION I/C	PERFIL AROMÁTICO
AEROBIAS			
Acetic acid, ethyl ester (CAS)	0,003466453	0,14	Olor dulce, similar a peras
1-Butanol, 3-methyl- (impure) (CAS)	0,042718704	0,48	olor desagradable
ANAEROBIAS			
1-Butanol, 3-methyl- (impure) (CAS)	0,018212412	0,43	olor desagradable
Acetic acid, ethyl ester (CAS)	0,003736017	0,14	Olor dulce, similar a peras
Benzeneethanol (CAS)	0,036409764	0,15	Dulce, a rosas
FUENTE: PERFIL AROMÁTICO: COMMON FRAGRANCE AND FLAVOR MATERIALS, 2006			
ELABORADO POR: SULAY ZAMBRANO			

TABLA 22

COMPUESTOS AROMÁTICOS CON VALOR P < A 0,05 DURANTE EL DIA 4 DE FERMENTACIÓN

<i>Bacillus subtilis</i>			
COMPUESTO	RESULTADO	RELACION I/C	PERFIL AROMÁTICO
AEROBIAS			
Acetic acid	0,023319215	1,7	Nuez
Benzaldehyde	0,005454209	6,4	Almendras
Phenylvinylacetylene	0,029124964	14,8	Floral
Benzeneacetic acid, ethyl ester	0,005509081	0,3	Floral
ANAEROBIAS			
3-Penten-2-ol	0,042188661	1,8	flor, dulce, caramelo
Caffeine	0,021186197	5,0	Olor especifico
<i>Candida metapsilosis</i>			
COMPUESTO	RESULTADO	RELACION I/C	PERFIL AROMÁTICO
AEROBIAS			
B-PHENYLETHYL FORMATE	0,000262815	0,2	floral, rosas
Hexadecane	0,001199367	0,2	olor leve a cera
ANAEROBIAS			

ETHYLPHENYL ACETATE	0,006026429	0,15	dulce, miel
B-PHENYLETHYL FORMATE	3,43887E-05	0,02	floral, rosas
<i>Acetobacter ghanensis</i>			
COMPUESTO	RESULTADO	RELACION I/C	PERFIL AROMÁTICO
AEROBIAS			
ACETIC ACID	0,012477417	0,26	Nuez
BENZENEACETALDEHYDE	0,025047233	0,07	flor, dulce, caramelo
Pentadecane	0,036326396	0,5	olor leve a cera
ANAEROBIAS			
Benzeneethanol	0,01191825	2,6	miel, especias, rosa, lila, flores, caramelo
Acetic acid, 2-phenylethyl ester (CAS)	0,015854117	0,26	Floral
<i>Acetobacter pasteurianus</i>			
COMPUESTO	RESULTADO	RELACION I/C	PERFIL AROMÁTICO
AEROBIAS			
2-Naphthalene-sulfonic acid	0,006122072	6,0	olor característico
1-phenyl-(2,2,2-2H3)ethanone	0,00523924	1,2	Dulce
Benzeneacetaldehyde	0,027001626	0,1	flor, dulce, caramelo
ANAEROBIAS			

BENZENEACETALDEHYDE	0,043701549	0,3	flor, dulce, caramelo
(Z)-But-2-enyl benzoate	0,007411968	0,1	dulce, frutal
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>			
COMPUESTO	RESULTADO	RELACION I/C	PERFIL AROMÁTICO
AEROBIAS			
Ethanol	0,01958	0,05	Alcohólico
Benzophenone	0,003435127	0,13	Rosas
ETHYLPHENYL ACETATE	0,026452283	0,19	dulce, miel
ANAEROBIAS			
Ethanol	0,017887958	0,02	Alcohólico
ETHYLPHENYL ACETATE	0,000207438	0,40	dulce, miel
FUENTE: PERFIL AROMÁTICO: COMMON FRAGRANCE AND FLAVOR MATERIALS, 2006			

ELABORADO POR: MÓNICA PRADO

DISCUSION

En la presente tesis fueron aislados los diferentes microorganismos hallados durante cada uno de los días de fermentación evaluados, para de esta forma, encontrar su relación con los compuestos aromáticos obtenidos dentro de este proceso.

Durante el día cero de fermentación se encuentra una serie de compuestos atribuibles a bacterias lácticas y acéticas. De las cuales se puede observar que las únicas que establecen diferencias significativas en cuanto a la producción de etanol y benzeetanol (para el caso de las lácticas) fue el *Lactobacillus nagelii*. Así mismo, en el caso de las bacterias acéticas, se encuentra que tan solo *Acetobacter pasteurianus* tuvo incidencia en la formación de ácido acético y benzaldehídos.

De acuerdo a los resultados revisados en las Tablas 13 y 14 se puede observar que los microorganismos aislados e identificados durante los primeros dos días de fermentación fueron principalmente levaduras. Estudios realizados por Roham [45] , establecen que durante las primeras 48 horas (primera fase) se aislaron cepas de *Saccharomyces cerevisiae* y *Saccharomyces* sp, microorganismos a los cuales se les atribuye la mayor formación de alcohol a partir de los azúcares presentes en la pulpa del cacao como la sacarosa, fructosa y glucosa.

Estos microorganismos son capaces de producir entre el 18-20% de etanol. [46]

Según este estudio, se ve como la incidencia de las levaduras se mantiene incluso aun en el tercer día, donde la *Saccharomyce* presenta formación de alcoholes; luego su actividad continua en descenso hasta ya no representar una diferencia significativa respecto al incremento de los compuestos encontrados sin la actividad de estas especies.

A diferencia de los estudios realizados por Reed [46], durante el día 2 de fermentación también se encontró la presencia de *Candida metapsilosis*, la misma a la que se halló estadísticamente significativa en cuanto a la presencia de benzaldehídos y Butanal, ya que estos compuestos al ser comparados con los controles se observa una curva de crecimiento mayor.

En la segunda fase del proceso de fermentación del cacao, se ve favorecido el desarrollo de bacterias lácticas, del tipo *Lactobacillius* tales como *Lb. Fermentum* y *Lb. Nagelli* encargadas de fermentar los carbohidratos no degradados continuando con el consumo del ácido cítrico que se produce durante la primera fase[47]. Como compuestos representativos atribuibles a estos microorganismos se puede destacar el consumo de ácidos como el acético y la producción de ácido decanoico, el mismo que tiene un olor característico agradable frutal.

Además de la producción de Butanal 3-metil (olor desagradable) y acetaldehídos (olor dulce-cítrico como manzanas verdes).

En los días 2 y 3 de fermentación se halló presencia de bacterias acéticas como el *Acetobacter pasteurianus*, *Acetobacter syzygii* y *Acetobacter ghanensis*; la muerte del embrión que se da en esta etapa es atribuible a los cambios asociados a estas bacterias. Según estudios realizados por Nielsen [48] la intervención de las bacterias acéticas indican el inicio de la tercera fase del proceso de fermentación, estas bacterias transforman el etanol en ácido acético, generando una reacción exotérmica.

Aunque si bien según Nielsen la intervención se da primero por *Gluconobacter oxydans*, luego *A. syzygii* y *Acetobacter pasteurianus* y, al final de la fermentación, *Acetobacter tropicalis*. [49]. En esta investigación, las especies aisladas fueron *Acetobacter aceti* y *Acetobacter pasteurianus*, finalizando al cuarto día con la presencia de *A. Ghanensis*, esta última también se encuentra en el día dos pero al no presentar grandes diferencias en relación a los otros días de fermentación, su producción de compuestos no fue considerado significativo; a pesar de esto los compuestos detectados durante su intervención se mencionan en la tabla 11E del apéndice E. Continuando con el *Acetobacter aceti* y el *A. pasteurianus*, estas básicamente son responsables del incremento de los compuestos alcohólicos tales como

ácido acético, ácido decanoico, y benzaetanoles. Algo importante a destacar es que si bien durante el día dos se detectó la presencia de *Acetobacter syzygii* y *Acetobacter pasteurianus*, es el segundo el que representa una diferencia significativa en cuanto a la producción de los compuestos mencionados.

Otros microorganismos hallados durante el aislamiento fueron *Bacillus amyloliquefaciens* y *Bacillus subtilis*, responsables de la formación de ciertos compuestos de aroma como los benzaldehídos, fenilacetaldehidos, fenilvinilacetaldehído y ácido benzenoacetico. Los microorganismos del género *Bacillus* son conocidos por producir enzimas proteolíticas que degradan las proteínas y pueden ocasionar olores desagradables, pero también contribuyen con la generación de ácidos orgánicos y saborizantes como el 2,3 Butanodiol según lo indican estudios realizados por Ardhana y Fleet. [50].

Durante el cuarto día continua la actividad de los *Bacillus amyloliquefaciens* y *Bacillus subtilis*, así como también del *Acetobacter pasteurianus* y *Acetobacter ghanensis*, todos ellos marcan una diferencia significativa en cuanto a la presencia de ácidos, aldehídos y benzenos. Algo importante a destacar es que como se observa en la tabla 20E del apéndice E existe un aumento en la cantidad de cafeína atribuible a la actividad del *Bacillus subtilis*.

Nielsen [48] encontró que existe una correlación entre el aroma del cacao y un conjunto de microorganismos que lo fermentan, estos fueron identificados mediante el uso de técnicas modernas como la Electroforesis en Gel con Gradiente Desnaturalizante (DGGE). Estadísticamente con las pruebas experimentales realizadas durante el desarrollo del trabajo se encuentra una validez y similitud con los resultados obtenidos por Nielsen. [48]

En resumen existe una relación existente entre los microorganismos presentes durante la fermentación y la generación de compuestos específicos de aroma del cacao.

CAPÍTULO 5

5. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

Conclusiones

1. La fermentación del cacao es un proceso complicado, en la que intervienen diferentes microorganismos que actúan de forma secuencial para modificar las características del grano. Los microorganismos identificados durante los primeros 4 días de fermentación variaron entre bacterias y levaduras.
2. En el día cero y día uno los microorganismos identificados fueron *Lactobacillus nagelii*, *Saccharomyces cerevisiae* y *Acetobacter*
3. *pasteurianus*. Durante el día 2 *Saccharomyces cerevisiae*, *Acetobacter ghanensis*, *Lactobacillus fermentum*, *Candida metapsilosis*, *Bacillus amyloliquefaciens*. En el día 3 *Saccharomyces cerevisiae*, *Acetobacter ghanensis*, *Lactobacillus nagelii* y *Lactobacillus fermentum*. Y finalmente en el día 4 *Acetobacter pasteurianus*, *Acetobacter ghanensis*, *Candida metapsilosis*, *Bacillus amyloliquefaciens* y *Bacillus subtilis*.

4. Durante el día 0 de fermentación, la acción del *Lactobacillus nagelii* fue favorable en condiciones anaerobias generando un aumento en los compuestos Benzeneethanol y (3R)-3-Phenyl-2,3-dihydro-1H-isoindol que poseen un perfil aromático floral, el cual es apetecible en un grano de cacao de fino aroma. Mientras este microorganismo en condiciones aerobias generó una disminución del Etanol, Benzaldehído y 1-[2-(2-Methylbutyl) phenyl]ethanone provocando un descenso en el aroma a rosas. La acción de la *Saccharomyces cerevisiae*, se vio favorecida en condiciones aerobias con un aumento principalmente del Benzeneethanol, mientras que el *Acetobacter ghanensis* intensifica el aroma a nuez y rosas con la generación del Ácido acético y el Benzeneethanol respectivamente.
5. En el día 1 de fermentación, la generación de compuestos de los microorganismos identificados fue poco significativa. El *Lactobacillus nagelii* en condiciones anaerobias generó un aumento en el Benzeneethanol cuyo perfil aromático es floral. El *Acetobacter ghanensis* tanto en condiciones aerobias y anaerobias produjo una disminución de los compuestos que le dan al grano un aroma floral y a almendras. La *Saccharomyces cerevisiae*, generó un aumento significativo del 2,3-Butanediol en condiciones aerobias lo que intensifica el aroma a mantequilla, y en condiciones anaerobias

potenció el aroma floral con el aumento del compuesto 2-Propyldecan-1-ol.

6. Durante el día dos, la bacteria *Acetobacter ghanensis*, a pesar de la producción evidente de ciertos compuestos como el fenol y el fenilacetaldehído, estos no representan un aumento significativo con respecto a la presencia de dicho microorganismo, es decir aun en ausencia del mismo el aumento de estos compuestos se hubiese producido, no obstante durante el tercer día, se observa una diferencia ya significativa en la formación de ácido decanoico y aumento de benzetanol y ácido acético tanto en condiciones aeróbicas como anaeróbicas.
7. La bacteria *Acetobacter ssyzygii* presente durante el día dos de fermentación, no solo interviene en la formación de ácido acético gracias al consumo de etanol presente, sino también provoca el consumo de benzaldehídos en condiciones tanto aeróbicas como anaeróbicas.
8. De los *Lactobacillus* inoculados durante el día tres, fue el *L. fermentum* el que presentó mayor actividad al momento de la producción de compuestos de aroma tales como el ácido decanoico que posee un agradable aroma frutal. Así mismo se evidenció el consumo del ácido acético durante la presencia tanto de *Lactobacillus fermentum* como de *Lactobacillus nagelii*.

9. En el día 4 de fermentación, la actividad del *Bacillus subtilis* en condiciones aerobias produjo un aumento del Phenylvinylacetylene principalmente, intensificando el aroma floral. Otros compuestos generados fueron Ácido acético y Benzaldehído intensificando un aroma a nuez y almendras respectivamente. La *Cándida metapsilosis* tuvo un efecto negativo sobre el aroma , causando el consumo de los compuestos de perfil aromático floral y a rosas. El *Acetobacter ghanensis* en condiciones anaerobias genera un incremento en el Benzeneethanol (aroma floral), disminuyendo la concentración de Ácido acético (aroma a nuez) en condiciones aerobias. El *Acetobacter pasteurianus* generó un incremento en el aroma dulce de los granos de cacao fermentados con el aumento del 1-phenyl-(2,2,2-2H3)ethanone en condiciones aerobias, mientras que en condiciones anaerobias disminuye el aroma floral. El *Bacillus amyloliquefaciens* tuvo un efecto negativo al reducir los compuestos de aroma floral y rosas presentes en el grano fermentado.
10. Se recomienda que durante el día 0 de fermentación se inocule la *Saccharomyces cervicae* y *Acetobacter ghanensis* en condiciones aerobias para intensificar el aroma floral y a rosas en los granos de cacao.

11. Durante el día 1 de fermentación, es recomendable se inocule *Lactobacillus nagelii* y *Saccharomyces cerevisiae* en condiciones anaerobias de esta manera se fomenta la generación de compuestos con perfil aromático a rosas.
12. Durante el cuarto día de fermentación los microorganismos que son recomendables para inocular en los granos a fermentarse con *Bacillus subtilis*, *Acetobacter pasteurianus* en condiciones aerobias para el incremento de aroma a almendras y rosas, y el *Acetobacter ghanensis* en condiciones anaerobias cuyo perfil aromático es floral.
13. Algo importante a destacar es que si bien durante casi todos los tratamientos se observó la presencia de compuestos aromáticos que no eran agradables a la perspectiva del mercado como es el caso del 1-Butanol, 3-methyl-, dichos compuestos fueron disminuyendo durante el tiempo que duró la fermentación, es decir que no representan mayor riesgo.
14. Para trabajos posteriores se recomienda que el muestreo se realice en diferentes sectores del país y del mundo, ya que solo de esta forma se podrá comparar los resultados a fin de que sean verificados.

BIBLIOGRAFÍA

- 1) Amores, F., Jiménez, J., Peña, G., “Diferenciación del cacao nacional del ecuador y forastero de ghana mediante un grupo de compuestos volátiles constituyentes del aroma a cacao.,” Estación Experimental Tropical Pichilingue Programa Nacional de Cacao y Café, 2004
- 2) Angulo, J., L. Graziani de Fariñas, L. Ortiz de Bertorelli, and y P. Parra, Caracterización Física de La Semilla de Cacao (Theobroma Cacao L.) Criollo, Forastero Amazónico Y Trinitario de La Localidad de Cumboto, Estado Aragua (Estado Aragua –Venezuela, 2001), pp. 203–19
- 3) Ardhana, M.M., Fleet, G.H., “The Microbial Ecology of Cocoa Bean Fermentations in Indones,” International Journal of Food Microbiology, 2003, 87–89.
- 4) Belitz, G, Química de Los Alimentos, ed. by Acribia, 2da edn (Barcelona, España, 1997), p. 1035
- 5) Brandeau, J., “El Cacao” (Barcelona, Blume)
- 6) De Bruyne, K., Camu, N., de Vuyst, P. Vandamme, “Microorganismos Y Chocolate”,” Ghanian cocoa fermentation., 2010
- 7) Chanliau, S., “Marqueurs de La Qualite Aromatique Du Cacao. Influence de Lorigine. Renforcemente de Larome Dorigine Thermique” (Universidad Montpellier, 1998), p. 199

- 8) Cleenwerck, I., A. González, N., Camu, E., Engelbeen, P., de Vos, L., de Vuyst, "Acetobacter Fabarum, Sp. Nov., an Acetic Acid Bacterium from a Ghanian Cocoa Bean Heap Fermentation.," International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2008, 2180–85.
- 9) Cooper A., Poinar H.N, Ancient DNA: Do It Right or Not at All. (New York, USA, 2000), p. 119
- 10) Cros, E.; Mermet G.; Jenajean N.; Y Georges G., "Relation Précurseurs Développement de L'arôme Cacao" (Lagos-Nigeria, 1994), pp. 723–26
- 11) D, Giish W & States, Identification of Protein Coding Regions by Database Similarity Search (EEUU, 1993), pp. 266–73
- 12) Duina Posso Duque, Thaura Ghneim Herrera., Uso de Marcadores Microsatélites Para La Estimación de Diversidad Genética En Plantas (Altos de Pipe- Venezuela, 2008)
- 13) E, Omayra Rivera Denizard., and Idaris de Jesús. Maldonado, "Enzimas de Restricción Y Electroforesis de DNA" <<http://www.uprm.edu/biology/cursos/biologiageneral/EnzimasDNA.htm>>
- 14) Ecuador, Banco Central del, "Procedimientos para consulta de informacion ESTADISTICA DE COMERCIO EXTERIOR MEDIANTE INTERNET," 2014

- 15) Et, Macalady J., Dominant Microbial Populations in Limestone-Corroding Stream Biofilms, Frasassi Cave System, Italy. Applied and Environmental Microbiology. (EEUU, 2006), pp. 5596–5609
- 16) Experimento, Objetivo D E L, “DIGESTIÓN DEL FAGO LAMBDA”
- 17) G, Enríquez, Cultivo Del Cacao (Turrialba- Costa Rica, 1986)
- 18) Gc, G A S Chromatography, G C Ms, I N Food, Magdalena Ligor, Jan Wójcik, and Bogus Buszewski, “Application of the solid phase microextraction (SPME),” 13 (2004), 355–62
- 19) Gysel, Laura, “Metabolomic Analysis for Testing the Authenticity of Cocoa Beans,” 2014
- 20) H, Frederick, Manual de Cacao. Instituto Interamericano de Ciencias Agrícolas” (Turrialba, Costa Rica, 1961)
- 21) H, Schlegel, Microbiología General (EEUU, 1997), pp. 32–42
- 22) Hansen C., Delolmo M. & Burri C, “Enzyme Activities in Cocoa Beans During Fermentation” (EEUU, 1998), pp. 273–81
- 23) Hays J, Belkum A, Pelt E, Principles and Technical Aspects of PCR Amplification (EEUU, 2008), pp. 1–22
- 24) ICCO, “Monthly Averages of Daily Prices,” International Cocoa Organization, 2011
- 25) INEC, “Indices de Actividad Económica,” INA-R 2012, 2012
- 26) J, Dubón A. y Sánchez, Evaluación de Especies Forestales Tropicales En Asocio O Como Reemplazo de Sombras Para Cacao (Honduras, 2006), pp. 25–40

- 27) J., Bradeau, El Cacao. Técnicas Agrícolas Y Producciones Tropicales, ed. by Blume (Caracas, Venezuela, 1995), p. 35
- 28) J.L, Ceniz, Rapid Extraction of Fungal DNA for PCR Amplification (EEUU, 1992), p. 2380
- 29) Janusz Pawliszyn, "SPME Method," Pawliszyn Research Group, 1997
- 30) Liendo R, INIA., Procesamiento Del Cacao Para La Fabricación de Chocolate Y Sus Subproductos" (Estado Aragua –Venezuela, 2006)
- 31) Liendo, Rigel J, "Origen Del Aroma Del Cacao," CENIAP HOY No. 1, 2003, pp. 23–29
- 32) Moreno, L. J. Y Sánchez, J. A, "Beneficio Del Cacao" (Honduras, 1958), pp. 226–29
- 33) Nielsen, D.S., Teniola, O.D., Ban-Koffi, L., Owusu, M., Andersson, T.S. and Holzapfel, W.H., "The Microbiology of Ghanaian Cocoa Fermentations Analysed Using Culture-Dependent and Culture-Independent Methods.," International Journal of Food Microbiology, 2007, 168–86
- 34) P, López A. & Dimick, Enzymes Involved in Cocoa Curing, Food Enzymology, 2nd edn (Ireland:, 1991)
- 35) Panten, Horst Surburg and Johannes, Common Fragrance and Flavor Materials, 5th edn (London: British Library, 2006)
- 36) Pigache, Maxime., and Sébastien Bainville, Cacao Tipo "Nacional" vs. Cacao CCN51: ¿Quién Ganará El Partido?, 2005

- 37) Prescott H, KLEIN, Microbiología, 4th edn (EEUU, 1999), pp. 264–83
- 38) Proecuador, “Revista Lideres Ecuador,” Análisis Sectorial de Cacao y Derivados, 2011
- 39) R, Schwan, Cocoa Fermentations Conducted with a Defined Microbial Cocktail Inoculum. Applied and Environmental Microbiology, 1998
- 40) R., Sanger F. Coulson, A Rapid Method for Determining Sequences in DNA by Primed Synthesis with DNA Polymerase (EEUU, 1975), pp. 441–448
- 41) 46. Reed, P., Yeast Technology (Connecticut,EEUU, 1973), pp. 166–70
- 42) Roham, T.A., El Beneficiado Del Cacao. (Italia, 1958), pp. 40–45
- 43) Saltos, A; Sánchez V; Anzules A., Beneficio Del Cacao”. Taller de Entrenamiento En Calidad Física Y Organoléptica de Cacao. Memorias (Quevedo- Ecuador, 2006), p. 7
- 44) 1. Sánchez, Viviana, “Caracterización Organoléptica Del Cacao (Theobroma Cacao L .) , Para La Selección de Árboles Con Perfiles de Sabor de Interés Comercial” (Universidad Técnica Estatal de Quevedo, 2007), pp. 52–55
- 45) Schmid, Pamela, “Análisis de La Situación Actual Y Perspectivas Del Cacao Ecuatoriano Y Propuesta de Industrialización Local” (Universidad internacional del Ecuador, 2013), pp. 131–33
- 46) Sinagap, “III Censo Nacional Agropecuario,” 2013

- 47) T., Madigan M. T. Brock, Microbiología de Los Microorganismos (EEUU, 2005), pp. 180–219.
- 48) Thompson J, CLUSTAL W, Improving the Sensitivity of Progressive Multiple Sequence Alignment through Sequence Weighting, Position-Specific Gap Penalties and Weight Matrix Choice, Nucleic Acids Res (EEUU, 1994), pp. 4673–80.
- 49) Vivas, Jorge Y Humberto Reyes., Cacao Fermentación Y Secado (Estado Aragua, Venezuela, 1972)
- 50) W. G. C. Forsyth and V. C. Quesnel, “Cacao Polyphenolic Substances. 4. The Anthocyanin Pigments,” Biochemical Journal, 1957, 177–79

ANEXOS

ANEXO A

FICHA TECNICA PDA/PDB-DIFCO

Potato Dextrose Agar • Potato Dextrose Broth

Intended Use

Potato Dextrose Agar is used for the cultivation and enumeration of yeasts and molds.

Potato Dextrose Broth is used for cultivating yeasts and molds.

Potato Dextrose Agar meets *United States Pharmacopeia (USP)*, *European Pharmacopoeia (EP)* and *Japanese Pharmacopoeia (JP)*¹⁻³ performance specifications, where applicable.

Summary and Explanation

Potato Dextrose Agar is a general purpose medium for yeasts and molds that can be supplemented with acid or antibiotics to inhibit bacterial growth. It is used in plate count methods when testing food,^{4,6} dairy products⁷ and cosmetics.^{5,6} The *USP* lists Potato Dextrose Agar as one of the recommended media for use in the Microbial Enumeration Tests when testing nonsterile pharmaceutical products.¹

Potato Dextrose Agar can be used to grow clinically significant yeasts and molds.^{8,9} In addition, this medium is used to stimulate sporulation (slide preparations), maintain stock cultures of certain dermatophytes and differentiate atypical varieties of dermatophytes by pigment production.¹⁰

Potato Dextrose Broth is a general-purpose broth medium for yeasts and molds (Potato Dextrose Agar without the agar).

Principles of the Procedure

Potato starch, potato infusion and dextrose support luxuriant growth of fungi. Lowering the pH of the medium to approximately 3.5 with sterile tartaric acid achieves the inhibition of bacterial growth. It is important, however, to avoid heating the medium after it has been acidified because this action results in the hydrolysis of the agar and impairs its ability to solidify.

Formulae

Difco™ Potato Dextrose Agar

Approximate Formula* Per Liter	
Potato Starch (from infusion)**	4.0 g
Dextrose	20.0 g
Agar	15.0 g

*Adjusted and/or supplemented as required to meet performance criteria.
**Approximates 200 g of infusion from potatoes.

Difco™ Potato Dextrose Broth

Consists of the same ingredients without the agar.

Directions for Preparation from Dehydrated Product

1. Suspend the powder in 1 L of purified water:
Difco™ Potato Dextrose Agar – 39 g;
Difco™ Potato Dextrose Broth – 24 g.
Mix thoroughly.
2. Heat with frequent agitation and boil for 1 minute to completely dissolve the powder.
3. Autoclave at 121°C for 15 minutes.
4. To alter the reaction of the agar medium to pH 3.5, cool the base to 45-50°C and aseptically add an appropriate amount of sterile 10% tartaric acid to each liter of medium. Mix well. Do not reheat the medium.
5. Test samples of the finished product for performance using stable, typical control cultures.

Sample Collection and Handling

For clinical specimens, refer to laboratory procedures for details on specimen collection and handling.^{8,9}

For food, dairy and cosmetic samples, follow appropriate standard methods for details on sample collection and preparation according to sample type and geographic location.⁴⁻⁷

For pharmaceutical samples, refer to the *USP* for details on sample collection and preparation for testing of nonsterile products.¹

Procedure

For clinical specimens, refer to appropriate standard references for details on testing protocol to obtain isolated colonies from specimens using Potato Dextrose Agar.^{8,9}

For food, dairy and cosmetic samples, refer to appropriate standard references for details on test methods using Potato Dextrose Agar.⁴⁻⁷

For pharmaceutical samples, refer to *USP* General Chapter <61> for details on the examination of nonsterile products and Microbial Enumeration Tests using Potato Dextrose Agar.¹

ANEXO B

FICHA TECNICA EXTRACTO DE LEVADURA-BACTO YEAST EXTRACT AGAR (7707)

Intended Use

Yeast Extract Agar is used for the enumeration of microorganisms in potable and freshwater samples.

Product Summary and Explanation

In nature, all water contains some impurities. As water flows in streams, sits in lakes, and filters through layers of soil and rock in the ground, it dissolves or absorbs the substances that it touches. Microbial pathogens are often found in water frequently as a result of fecal matter from sewage discharges, leaking septic tanks, or runoff from animal feedlots.¹ Yeast Extract Agar is a rich, nutritious medium for the recovery of a wide range of bacteria, yeast, and molds. The combination of media ingredients and the appropriate incubation temperature of 36°C and 22°C allow the detection of a large number of microbial contaminants.

Yeast Extract Agar complies with the recommendation of ISO 6222² and the Swedish Standard SS 028171.

Principles of the Procedure

Yeast Extract and Peptone provide sources of nitrogen, amino acids, essential vitamins, and carbon required for organism growth. Agar is the solidifying agent.

Formula / Liter

Yeast Extract..... 3 g

Peptone..... 5 g

Agar 15 g

Final pH: 7.2 ± 0.2 at 25°C

Formula may be adjusted and/or supplemented as required to meet performance specifications.

Precautions

1. For Laboratory Use.

Directions

1. Dissolve 23 g of the medium in one liter of purified water.
2. Heat with frequent agitation and boil for one minute to completely dissolve the medium.
3. Autoclave at 121°C for 15 minutes.

Quality Control Specifications

Dehydrated Appearance: Powder is homogeneous, free flowing, and light to medium beige.

Prepared Appearance: Prepared medium is trace to slightly hazy and light beige.

Expected Cultural Response: Cultural response on Yeast Extract Agar were incubated aerobically at 37°C and 20 - 22°C. The cultures were examined for growth at 24 hours and 3 days, respectively.

Microorganism	Approx. Inoculum (CFU)	Expected Results
		24 hours at 37°C
<i>Escherichia coli</i> ATCC® 25922	10 - 300	Growth

Microorganism	Approx. Inoculum (CFU)	Expected Results
		3 days at 20 - 22°C
<i>Escherichia coli</i> ATCC® 25922	10 - 300	Growth

The organisms listed are the minimum that should be used for quality control testing.

ANEXO C

COMPARACIÓN DE LAS CONCENTRACIONES DE COMPUESTOS DE AROMA DE GRANOS DE CACAO CON DIFERENTES MÉTODOS DE ESTERILIZACIÓN.

TIEMPO	COMPUESTO	ÁREA		
		SIN UV	CON UV	AUTOCLAVE
1,46	Ethanol	268434	8143	11096
1,604	ACETIC ACID	487664	3037826	3004702
1,85	2-Isopropoxyethylamine	221628	0	0
1,95	(O-D)ethenol	126763	0	0
1,99	4,5-Dimethyl-1,3-dioxolan-2-one	514455	456729	0
2,06	a monoterpene alcohol	112091	0	0
2,18	Ethanamine, 2-propoxy-	0	0	213780
2,30	2-Isopropoxyethylamine	34492	471378	213780
3,33	1-Butanol, 3-methyl-, acetate	0	0	76625
3,36	1-Pentanol, 2-methyl-	0	0	149772
4,70	Benzaldehyde	113906	571296	71321
6,35	PHENYL ACETALDEHYDE	203848	1316484	11944
6,95	4-benzyloxy-3-penten-2-one	373547	1773713	184265
7,046	Ethanone, 2,2-dihydroxy-1-phenyl-	330903	0	0
7,23	Benzaldehyde, 4-methyl-	593323	331752	181619
7,95	Benzeneethanol	832678	1335452	2176583
11,45	B-PHENYLETHYL FORMATE	0	0	516666
11,47	Acetic acid, 2-phenylethyl ester	0	940853	0
14,92	Pentanal, 4-(benzoyloxy)-	0	0	77402
27,02	Hexadecanoic acid, trimethylsilyl	101520	0	0
FUENTE: CROMATÓGRAFO GC-MS				
ELABORADO	POR:	MÓNICA		PRADO

ANEXO E

TABLA 1E
COMPUESTOS AROMÁTICOS IDENTIFICADOS DURANTE EL DIA
0 DE FERMENTACIÓN (*Lactobacillus nagelii*)

REPLICA #1			
COMPUESTO	TIEMPO	C1CONUV	R1LN
Etanol	1,52	X	C
Butanal	1,64	X	X
Butanal, 3-methyl	1,91	X	C
2-Butanone, 3-hydroxy-	2,12	X	X
PROPENE 3,3,3-D3	2,12	X	X
2,3-Butanediol	2,48	X	P
3-Penten-2-ol	3,68	X	P
Benzaldehyde	4,8	X	C
Benzeneacetaldehyde	6,37	X	X
benzophenone	6,86	X	C
Benzaldehyde, 4-methyl	7,34	X	X
Linalool	7,5	X	X
Hydrazine, (phenylmethyl)-	7,89		P
Benzeneethanol	7,9	X	P
1-[2-(2-Methylbutyl)phenyl]ethanone	11,37	X	C
1-Octene	12,84	X	X
6-Amino-3,4,7-triphenylpyrid	13,19		P
5-Benzoxyhexanenitrile	14,9	X	P
\5-Benzoxyhexanenitrile	14,91	X	C
Heptadecane	14,98	X	X
Nonadecane	16,73	X	X
Undecane, 4-methyl-	16,99	X	X
1,3-Diphenyl-1-((trimethylsilyl)oxy)-1(Z)-heptene	17,46	X	X
REPLICA #2			
COMPUESTO	TIEMPO	C2CONUV	R2LN
Ethanol	1,52	X	X
: Butanal	1,65	X	X

Butanal, 3-methyl-	1,9	X	X
2-Butanone, 3-hydroxy	2,086	X	X
PROPENE 3,3,3-D3	2,12	X	
2,3-Butanediol	2,48	X	P
3-Penten-2-ol	3,68	X	P
Benzaldehyde	4,87	X	C
Benzeneacetaldehyde	6,41	X	C
Benzophenone	6,85	X	X
Linalool	7,47	X	X
Hydrazine, (phenylmethyl)-	7,89		P
Benzeneethanol	7,9	X	P
1-[2-(2-Methylbutyl)phenyl]ethanone	11,37	X	C
1-Octene	12,84	X	X
6-Amino-3,4,7-triphenylpyrido[2',3':4,5]thieno[2,3	13,19		P
5-Benzoxyhexanenitrile	14,9	X	P
\5-Benzoxyhexanenitrile	14,91	X	C
Heptadecane	14,98	X	X
Nonadecane	16,73	X	X
Undecane, 4-methyl-	16,99	X	X
1,3-Diphenyl-1-((trimethylsilyl)oxy)-1(Z)-heptene	17,46	X	X
REPLICA #3			
COMPUESTO	TIEMPO	C3CONUV	R3LN
Ethanol	1,52	X	X
: Butanal	1,65	X	X
Butanal, 3-methyl-	1,9	X	X
2-Butanone, 3-hydroxy	2,086	X	X
PROPENE 3,3,3-D3	2,12	X	X
2,3-Butanediol	2,48	X	P
3-Penten-2-ol	3,68	X	P
Benzaldehyde	4,83	X	C
Benzeneacetaldehyde	6,33	X	C
Benzophenone	6,85	X	X

L-LINALOOL	7,48	X	X
Hydrazine, (phenylmethyl)-	7,89	X	P
Benzeneethanol	7,9	X	P
1-[2-(2-Methylbutyl)phenyl]ethanone	11,37	X	C
1-Octene	12,84	X	X
6-Amino-3,4,7-triphenylpyrido[2',3':4,5]thieno[2,3	13,19	X	P
5-Benzoxyhexanenitrile	14,9	X	P
\5-Benzoxyhexanenitrile	14,91	X	C
Heptadecane	14,98	X	X
Nonadecane	16,73	X	X
Undecane, 4-methyl-	16,99	X	X
1,3-Diphenyl-1-((trimethylsilyl)oxy)-1(Z)-heptene	17,46	X	X
REPLICA #4			
COMPUESTO	TIEMPO	C1CONUV	R4LN
Ethanol	1,21	X	C
Propanedioic acid	1,7	X	P
Acetic acid	1,872	X	X
(3R)-3-Phenyl-2,3-dihydro-1H-isoindol	2,88	X	P
Benzaldehyde	4,8	X	C
9-(Methylthio)-8H-acenaphtho[1,2-c]pyrrole-7-carboxylic Acid	5,25	X	P
Benzeneacetaldehyde	6,35	X	C
benzophenone	6,86	X	
Acetophenone	6,86	X	P
Benzaldehyde, 4-methyl- (CAS	7,19	X	C
LINALOOL	7,48	X	P
Benzeneethanol	7,89	X	P
Phytane	9,921	X	P
1-[2-(2-Methylbutyl)phenyl]ethanone	11,35	X	P
1-Octanol, 2-butyl	12,85	X	P
Hexadecane, 2-methyl	13,76	X	P
Benzoic acid, pent-2-yl ester	14,8	X	P

Pentatriacontane	17,42	X	P
9-propylphenanthrene	17,76	X	P
Oxalic acid, allyl octadecyl ester	19,77	X	P
REPLICA #5			
COMPUESTO	TIEMPO	C2CONUV	R5LN
Ethanol	1,21	X	C
Propanedioic acid	1,7	X	P
Acetic acid	1,872	X	X
(3R)-3-Phenyl-2,3-dihydro-1H-isoindol	2,88	X	P
Benzaldehyde	4,8	X	C
9-(Methylthio)-8H-acenaphtho[1,2-c]pyrrole-7-carboxylic Acid	5,25	X	P
Benzeneacetaldehyde	6,35	X	C
Benzophenone	6,86	X	X
Acetophenone	6,86	X	P
Benzaldehyde, 4-methyl- (CAS	7,19	X	
L-LINALOOL	7,48	X	P
Benzeneethano	7,89	X	P
Phytane	9,921	X	P
1-[2-(2-Methylbutyl)phenyl]ethanone	11,35	X	P
1-Octanol, 2-butyl	12,85	X	P
Hexadecane, 2-methyl	13,76	X	P
Benzoic acid, pent-2-yl ester	14,8	X	P
Pentatriacontane	17,42	X	P
9-propylphenanthrene	17,76	X	P
Oxalic acid, allyl octadecyl ester	19,77	X	P
REPLICA #6			
COMPUESTO	TIEMPO	C3CONUV	R6LN
Ethanol	1,58	X	
FORMAMIDINE ACETATE	1,71	X	P
Acetic acid	1,92	X	
(3R)-3-Phenyl-2,3-dihydro-1H-isoindol-1-one	2,89	X	P
Benzaldehyde	5	X	C

1-Amino-1-ortho-chlorophenyl- 2-(2-quinoxaliny)ethene	5,4	X	P
Benzeneacetaldehyde	6,34	X	C
Benzophenone	6,86	X	X
Acetophenone	6,84	X	P
Benzaldehyde, 4-methyl- (CAS	7,19	X	X
LINALOOL	7,48	X	P
Benzeneethanol	7,9	X	P
Phytane	9,921	X	P
1-Octanol, 2-butyl	12,85	X	P
Hexadecane, 2-methyl	13,76	X	P
Benzoic acid, pent-2-yl ester	14,8	X	P
Pentatriacontane	17,42	X	P
9-propylphenanthrene	17,76	X	P
Oxalic acid, allyl hexadecyl ester	18,66	X	P

TABLA 2E
COMPUESTOS AROMÁTICOS IDENTIFICADOS DURANTE EL DIA
0 DE FERMENTACIÓN (*Saccharomyces cerevisiae*)

REPLICA #1			
COMPUESTO	TIEMPO	C1CONU V	R1S C
Ethanol	1,52	X	X
Peracetic Acid	1,68	X	P
Butanal, 3-methyl-	1,87	X	C
2-Butanone, 3-hydroxy-	2,22	X	P
2,4 PENTADIENAL	2,66	X	P
benzyl 2,2'-di-O-methyldivaricatate	2,77	X	P
(3R)-3-Phenyl-2,3-dihydro-1H-isoindol-1-one	2,88	X	P
1-Hexanol	3,29	X	P
2-Heptanone, 6-methyl-5-nitro- (CAS)	4,21	X	P
Benzaldehyde	4,8	X	C
1-Cyano-1-trimethylsilyl-2-p-toluenesulfonylethane	5,24	X	P
Benzeneacetaldehyde	6,35	X	P
benzophenone	6,86	X	C
Acetophenone	6,86	X	C
Benzaldehyde, 4-methyl-	7,2	X	C
Linalool	7,48	X	P
Benzeneethanol	7,9	X	P
1,3-Dimethyl-2,4-dioxo-6-methyl-8-(p-nitrophenyl	8,77	X	P
1-[2-(2-Methylbutyl)phenyl]ethanone	11,35	X	X
2-Octyldodecan-1-ol	12,63	X	C
2,4,6,8-Tetramethyl-1-undecene	12,86	X	X
1-phenyl-(2,2,2-2H3)ethanone	14,92	X	C
Nonadecane	16,54	X	X
REPLICA #2			
COMPUESTO	TIEMPO	C2CONU V	R2S C
Ethanol	1,52	X	X
Peracetic Acid	1,68	X	P

Butanal, 3-methyl-	1,9	X	C
2-Butanone, 3-hydroxy-	2,22	X	P
2,3-Butanediol	2,49	X	P
2,4 PENTADIENAL	2,66	X	P
benzyl 2,2'-di-O-methyldivaricatate	2,77	X	P
(3R)-3-Phenyl-2,3-dihydro-1H-isoindol-1-one	2,88	X	P
1-Hexanol	3,29	X	P
2-Heptanone, 6-methyl-5-nitro- (CAS)	4,21	X	C
Benzaldehyde	4,91	X	P
1-Cyano-1-trimethylsilyl-2-p-toluenesulfonylethane	5,24	X	P
Benzeneacetaldehyde	6,38	X	C
benzophenone	6,85	X	C
Acetophenone	6,85	X	C
Benzaldehyde, 4-methyl-	7,2	X	P
Linalool	7,48	X	P
Benzeneethanol	7,89	X	P
1,3-Dimethyl-2,4-dioxo-6-methyl-8-(p-nitrophenyl	8,77	X	X
1-[2-(2-Methylbutyl)phenyl]ethanone	11,35	X	C
2-Octyldodecan-1-ol	12,63	X	X
2,4,6,8-Tetramethyl-1-undecene	12,86	X	C
1-phenyl-(2,2,2-H ₃)ethanone	14,92	X	X
Nonadecane	16,54	X	X
REPLICA #3			
COMPUESTO	TIEMPO	C3CONU V	R3S C
Butanal	1,68	X	X
Peracetic Acid	1,68	X	P
Butanal, 3-methyl-	1,92	X	C
2-Butanone, 3-hydroxy-	2,22	X	P
2,3-Butanediol	2,49	X	P
2,4 PENTADIENAL	2,66	X	P
benzyl 2,2'-di-O-methyldivaricatate	2,77	X	P
(3R)-3-Phenyl-2,3-dihydro-1H-isoindol-1-one	2,88	X	P
1-Hexanol	3,29	X	P
2-Heptanone, 6-methyl-5-nitro- (CAS)	4,21	X	C
Benzaldehyde	5	X	P
1-Cyano-1-trimethylsilyl-2-p-toluenesulfonylethane	5,24	X	P
Benzeneacetaldehyde	6,34	X	C
Linalool	7,48	X	C

benzophenone	6,85	X	C
Acetophenone	6,85	X	P
Benzeneethanol	7,9	X	P
1,3-Dimethyl-2,4-dioxo-6-methyl-8-(p-nitrophenyl	8,77	X	P
1-[2-(2-Methylbutyl)phenyl]ethanone	11,35	X	X
2-Octyldodecan-1-ol	12,63	X	C
2,4,6,8-Tetramethyl-1-undecene	12,86	X	X
1-phenyl-(2,2,2-2H3)ethanone	14,92	X	C
Nonadecane	16,54	X	X
REPLICA #4			
COMPUESTO	TIEMPO	C1CONU V	R4S C
Ethanol	1,52	X	X
Butanal	1,64	X	X
Peracetic Acid	1,69	X	P
FORMAMIDINE ACETATE	1,72	X	X
Butanal, 3-methyl-	1,82	X	C
2-Isopropoxyethylamine	2,046	X	C
Benzaldehyde	4,8	X	C
Benzeneacetaldehyde	6,36	X	C
benzophenone	6,86	X	X
Acetophenone	6,86	X	X
Benzaldehyde, 3-methyl-	7,2	X	C
Linalool	7,49	X	P
Hexadecane	9,92	X	X
Heptadecane, 2-methyl-	9,93	X	X
1-[2-(2-Methylbutyl)phenyl]ethanone	11,35	X	X
5,9-Dimethylundec-1-ene	12,86	X	C
Heptadecane	15	X	C
Nonadecane	16,54	X	C
Undecane, 4-methyl-	16,91	X	C
4-Octadecanolide	19,11	X	P
REPLICA #5			
COMPUESTO	TIEMPO	C2CONU V	R5S C
Ethanol	1,52	X	X
Butanal	1,64	X	X
Peracetic Acid	1,69	X	P
FORMAMIDINE ACETATE	1,72	X	X

Butanal, 3-methyl-	1,87	X	C
2-Isopropoxyethylamine	2,046	X	C
Benzaldehyde	4,95	X	C
Benzeneacetaldehyde	6,37	X	C
Benzophenone	6,86	X	X
Acetophenone	6,86	X	X
Benzaldehyde, 3-methyl-	7,2	X	C
Linalool	7,49	X	P
Hexadecane	9,92	X	X
Heptadecane, 2-methyl-	9,93	X	X
1-[2-(2-Methylbutyl)phenyl]ethanone	11,35	X	X
5,9-Dimethylundec-1-ene	12,86	X	C
Heptadecane	15	X	C
Nonadecane	16,54	X	C
Undecane, 4-methyl-	16,91	X	C
4-Octadecanolide	19,11	X	P
REPLICA #6			
COMPUESTO	TIEMPO	C3CONU V	R6S C
Ethanol	1,52	X	X
Butanal	1,64	X	X
Peracetic Acid	1,69	X	P
FORMAMIDINE ACETATE	1,72	X	X
Butanal, 3-methyl-	1,82	X	C
2-Isopropoxyethylamine	2,046	X	C
Benzaldehyde	4,8	X	C
Benzeneacetaldehyde	6,36	X	C
Benzophenone	6,86	X	X
Acetophenone	6,86	X	X
Benzaldehyde, 3-methyl-	7,2	X	C
Linalool	7,49	X	P
Hexadecane	9,92	X	X
Heptadecane, 2-methyl-	9,93	X	X
1-[2-(2-Methylbutyl)phenyl]ethanone	11,37	X	X
5,9-Dimethylundec-1-ene	12,86	X	C
Heptadecane	15	X	C
Nonadecane	16,54	X	C
Undecane, 4-methyl-	16,91	X	C
4-Octadecanolide	19,11	X	P

TABLA 3E

**COMPUESTOS AROMÁTICOS IDENTIFICADOS DURANTE EL DIA
0 DE FERMENTACIÓN (*Acetobacter pasteurianus*)**

REPLICA #1			
COMPUESTO	TIEMPO	C1CONUV	R1AP
Acetaldehyde	1,51	X	X
Ethanol	1,54	X	X
Butanal	1,66	X	X
Acetic acid	1,69	X	P
Peracetic Acid	1,87	X	X
Butanal, 3-methyl-	1,872	X	X
2-Isopropoxyethylamine	2,039	X	P
2-Naphthalene-sulfonic acid	2,88	X	P
Benzaldehyde	4,73	X	C
BENZENEACETALDEHYDE	6,37	X	X
Benzophenone	6,88	X	C
Benzaldehyde, 4-methyl	7,19	X	X
Linalool	7,5	X	P
Benzeneethanol	7,9	X	P
1-phenyl-(2,2,2-H ₃)ethanone	14,91	X	X
REPLICA #2			
COMPUESTO	TIEMPO	C2CONUV	R2AP
Acetaldehyde	1,51	X	X
Ethanol	1,54	X	X
Butanal	1,66	X	X
Acetic acid	1,68	X	P
Peracetic Acid	1,87	X	X
Butanal, 3-methyl-	1,9	X	X
2-Isopropoxyethylamine	2,039	X	P
2-Naphthalene-sulfonic acid	2,88	X	P
Benzaldehyde	4,89	X	C
BENZENEACETALDEHYDE	6,37	X	X
Benzophenone	6,88	X	C

Benzaldehyde, 4-methyl	7,19	X	X
Linalool	7,5	X	P
Benzeneethanol	7,9	X	P
1-phenyl-(2,2,2-2H3)ethanone	14,91	X	X
REPLICA #3			
COMPUESTO	TIEMPO	C3CONUV	R3AP
Acetaldehyde	1,51	X	X
Ethanol	1,53	X	X
Butanal	1,66	X	X
ACETIC ACID	1,69	X	P
Peracetic Acid	1,87	X	X
Butanal, 3-methyl	1,92	X	X
2-Isopropoxyethylamine	2,039	X	P
2-Naphthalene-sulfonic acid	2,88	X	P
Benzaldehyde	4,8	X	C
Benzeneacetaldehyde	6,34	X	C
BENZENEACETALDEHYDE	6,37	X	X
benzophenone	6,88	X	C
Linalool	7,5	X	P
Benzeneethanol	7,9	X	P
1-phenyl-(2,2,2-2H3)ethanone	14,91	X	X
REPLICA #4			
COMPUESTO	TIEMPO	C1CONUV	R4AP
Ethanol	1,52	X	X
Butanal	1,64	X	X
ACETIC ACID	1,69	X	P
(3R)-3-Phenyl-2,3-dihydro-1H-isoindol-1-one	2,89	X	P
Benzaldehyde	5,12	X	C
Benzeneacetaldehyde	6,37	X	C
Acetophenone	6,86	X	X
Linalool	7,49	X	X
Benzylhydrazine	7,9	X	P
2,4,6,8-Tetramethyl-1-undecene	12,85	X	X
1-[2-(2-Methylbutyl)phenyl]ethanone	11,37	X	X
1-phenyl-(2,2,2-2H3)ethanone	14,9	X	P
Nonadecane	16,73	X	X
REPLICA #5			

COMPUESTO	TIEMPO	C2CONUV	R5AP
Ethanol	1,52	X	X
Butanal	1,648	X	X
ACETIC ACID	1,69	X	P
Butanal, 3-methyl-	1,9	X	C
(3R)-3-Phenyl-2,3-dihydro-1H-isoindol-1-one	2,89	X	P
Benzaldehyde	4,92	X	C
BENZENEACETALDEHYDE	6,35	X	C
Acetophenone	6,86	X	X
Linalool	7,49	X	X
Benzylhydrazine	7,9	X	P
1-[2-(2-Methylbutyl)phenyl]ethanone	11,37	X	X
2,4,6,8-Tetramethyl-1-undecene	12,85	X	X
1-phenyl-(2,2,2-2H3)ethanone	14,9	X	P
Nonadecane	16,73	X	X
REPLICA #6			
COMPUESTO	TIEMPO	C3CONUV	R6AP
Ethanol	1,53	X	X
Butanal	1,648	X	X
ACETIC ACID	1,69	X	P
Butanal, 3-methyl	1,92	X	X
(3R)-3-Phenyl-2,3-dihydro-1H-isoindol-1-one	2,89	X	P
Benzaldehyde	4,8	X	C
Benzeneacetaldehyde	6,34	X	C
Acetophenone	6,86	X	X
Linalool	7,48	X	X
Benzylhydrazine	7,9	X	P
1-phenyl-(2,2,2-2H3)ethanone	14,9	X	P
Nonadecane	16,73	X	X

TABLA 4E

**COMPUESTOS AROMÁTICOS IDENTIFICADOS DURANTE EL DIA
1 DE FERMENTACIÓN (*Lactobacillus nagelii*).**

REPLICA #1			
COMPUESTO	TIEMPO	C1CONUV	R1LN
Ethanol	1,15	X	X
Butanal	1,64	X	X
ACETIC ACID	1,7	X	P
Acetic acid ethenyl	1,752	X	X
Butanal, 3-methyl-	1,823	X	X
2-Butanone, 3-hydroxy	2,12	X	P
2-Pentanol	2,22	X	P
2-Propanol	2,44	X	P
2,3-Butanediol	2,48	X	X
3R)-3-Phenyl-2,3-dihydro-1H-isoindol-1	3	X	P
Benzaldehyde	4,87	X	C
1-Amino-1-ortho-chlorophenyl-2-(2-quinoxaliny)ethene	5,26	X	P
Benzeneacetaldehyde	6,37	X	P
benzophenone	6,84	X	C
Benzaldehyde, 4-methyl-	7,21	X	X
Phenol, 2-methoxy-	7,34	X	X
1,6-Octadien-3-ol, 3,7-dimethyl-, (.+.-)- (CAS)	7,49	X	P
Linalool	7,501	X	X
Benzeneethanol	7,9	X	P
1-[2-(2-Methylbutyl)phenyl]ethanone	11,37	X	X
2-Propyldecan-1-ol	12,64	X	X
1-phenyl-(2,2,2-2H3)ethanone	14,91	X	X
REPLICA #2			
COMPUESTO	TIEMPO	C2CONUV	R2LN

Ethanol	1,52	X	X
Butanal	1,65	X	X
ACETIC ACID	1,7	X	P
Acetic acid ethenyl	1,72	X	X
Butanal, 3-methyl-	1,823	X	X
2-Butanone, 3-hydroxy- (	2,03	X	P
(R)-(-)-3-Methyl-2-butanol	2,05	X	X
2-Butanone, 3-hydroxy	2,11	X	X
: 2-Pentanol	2,22	X	P
2-Pentanol	2,23	X	P
1-Butanol, 3-methyl- (impure) (	2,24	X	X
2-Propanol	2,44	X	P
2,3-Butanediol	2,48	X	X
: N-ethyl-1,3-dithioisindoline	2,62	X	P
3R)-3-Phenyl-2,3-dihydro-1H-isoindol-1	3	X	P
Benzaldehyde	4,86	X	C
1-Amino-1-ortho-chlorophenyl-2-(2-quinoxaliny)ethene	5,26	X	P
Benzophenone	6,84	X	C
Benzaldehyde, 4-methyl-	7,21	X	X
Phenol, 2-methoxy-	7,34	X	X
1,6-Octadien-3-ol, 3,7-dimethyl-, (.+-.)- (CAS)	7,49	X	P
Linalool	7,501	X	X
Benzeneethanol	7,9	X	P
1-[2-(2-Methylbutyl)phenyl]ethanone	11,35	X	X
2-Propyldecan-1-ol	12,64	X	X
1-phenyl-(2,2,2-2H3)ethanone	14,91	X	X
REPLICA #3			
COMPUESTO	TIEMPO	C3CONUV	R3LN
Ethanol	1,58	X	X
Butanal	1,65	X	X
ACETIC ACID	1,7	X	P
Peracetic Acid	1,81	X	X
Acetic acid ethenyl	1,72	X	X
Butanal, 3-methyl-	1,823	X	X

2-Butanone, 3-hydroxy- (	2,03	X	P
(R)-(-)-3-Methyl-2-butanol	2,05	X	X
2-Butanone, 3-hydroxy	2,11	X	X
2-Pentanol	2,22	X	P
2-Pentanol	2,23	X	P
1-Butanol, 3-methyl- (impure) (	2,24	X	X
2-Propanol	2,44	X	P
2,3-Butanediol	2,48	X	P
N-ethyl-1,3-dithioisindoline	2,62	X	P
(3R)-3-Phenyl-2,3-dihydro-1H-isoindol-1	3	X	P
Benzaldehyde	4,86	X	C
1-Amino-1-ortho-chlorophenyl-2-(2-quinoxaliny)ethene	5,26	X	P
Benzophenone	6,84	X	C
Benzaldehyde, 4-methyl-	7,21	X	X
Phenol, 2-methoxy-	7,34	X	X
1,6-Octadien-3-ol, 3,7-dimethyl-, (.+.-)- (CAS)	7,49	X	P
Linalool	7,501	X	X
Benzeneethanol	7,9	X	P
1-[2-(2-Methylbutyl)phenyl]ethanone	11,35	X	X
2-Propyldecan-1-ol	12,64	X	X
1-phenyl-(2,2,2-2H3)ethanone	14,91	X	X
REPLICA #4			
COMPUESTO	TIEMPO	C1CONUV	R4LN
Ethanol	1,52	X	X
Butanal	1,64	X	X
FORMAMIDINE ACETATE	1,72	X	P
Butanal, 3-methyl-	1,87	X	X
2-Butanone, 3-hydroxy-	2,12	X	P
(3R)-3-Phenyl-2,3-dihydro-1H-isoindol-1-one	2,88	X	P
Benzaldehyde	4,84	X	C
Benzeneacetaldehyde	6,36	X	C
Ethanone, 1-phenyl-	6,88	X	P
Benzaldehyde, 4-methyl	7,19	X	X

L-LINALOOL	7,498	X	P
Benzeneethanol	7,9	X	P
Hexadecane, 2,6,10,14-tetramethyl-(CAS)	9,9	X	P
1-[2-(2-Methylbutyl)phenyl]ethanone	11,345	X	X
2-Propyldecan-1-ol	12,64	X	X
2-Octyldodecan-1-ol	13,07	X	X
PSEUDOLAUDANINE	15,27	X	P
1-Heptanol, 2-propyl-	16,23	X	P
Tritriacontane	17,43	X	P
Oxalic acid, allyl pentadecyl ester	19,96	X	P
REPLICA #5			
COMPUESTO	TIEMPO	C2CONUV	R5LN
Ethanol	1,52	X	X
Butanal	1,64	X	X
FORMAMIDINE ACETATE	1,72	X	P
Butanal, 3-methyl	1,89	X	X
2-Butanone, 3-hydroxy-	2,12	X	P
(3R)-3-Phenyl-2,3-dihydro-1H-isoindol-1-one	2,88	X	P
Benzaldehyde	4,9	X	C
Benzeneacetaldehyde	6,36	X	C
Ethanone, 1-phenyl-	6,88	X	P
Benzaldehyde, 4-methyl	7,19	X	X
L-LINALOOL	7,498	X	P
Benzeneethanol	7,9	X	P
Hexadecane, 2,6,10,14-tetramethyl-(CAS)	9,9	X	P
1-[2-(2-Methylbutyl)phenyl]ethanone	11,345	X	X
2-Propyldecan-1-ol	12,64	X	X
2-Octyldodecan-1-ol	13,07	X	X
PSEUDOLAUDANINE	15,27	X	P
1-Heptanol, 2-propyl-	16,23	X	P
Tritriacontane	17,43	X	P
Oxalic acid, allyl pentadecyl ester	19,96	X	P
REPLICA #6			
COMPUESTO	TIEMPO	C3CONUV	R6LN

Ethanol	1,593	X	X
Butanal	1,64	X	X
FORMAMIDINE ACETATE	1,72	X	P
Butanal, 3-methyl-	1,93	X	X
2-Butanone, 3-hydroxy-	2,12	X	P
(3R)-3-Phenyl-2,3-dihydro-1H-isoindol-1-one	2,88	X	P
Benzaldehyde	4,9	X	C
Benzeneacetaldehyde	6,37	X	C
Ethanone, 1-phenyl-	6,88	X	P
Benzaldehyde, 4-methyl	7,19	X	X
L-LINALOOL	7,498	X	P
Benzeneethanol	7,903	X	P
Hexadecane, 2,6,10,14-tetramethyl-(CAS)	9,9	X	P
1-[2-(2-Methylbutyl)phenyl]ethanone	11,345	X	X
2-Propyldecan-1-ol	12,64	X	X
2-Octyldodecan-1-ol	13,07	X	X
PSEUDOLAUDANINE	15,27	X	P
1-Heptanol, 2-propyl-	16,23	X	P
Tritriacontane	17,43	X	P
Oxalic acid, allyl pentadecyl ester	19,96	X	P

TABLA 5E

**COMPUESTOS AROMÁTICOS IDENTIFICADOS DURANTE EL DIA
1 DE FERMENTACIÓN (*Saccharomyces cerevisiae*).**

REPLICA #1			
COMPUESTO	TIEMPO	C1CONUV	R1SC
Ethanol	1,52	X	X
Peracetic Acid	1,68	X	P
Butanal, 3-methyl-	1,87	X	X
2-Pentanol	2,23	X	P
2-Isopropoxyethylamine	2,37	X	X
2,3-Butanediol	2,5	X	P
2,4 PENTADIENAL	2,66	X	P
(3R)-3-Phenyl-2,3-dihydro-1H-isoindol-1-one	2,89	X	P
2-Hexanone, 4-methyl- (	4,29	X	P
Benzaldehyde	4,86	X	C
9-(Methylthio)-8H-acenaphtho[1,2-c]pyrrole-7-carboxylic Acid	5,25	X	P
Benzeneacetaldehyde	6,36	X	P
Benzeneacetaldehyde	6,37	X	X
Ethanone, 1-phenyl-	6,86	X	X
benzophenone	6,98	X	X
Benzaldehyde, 4-methyl-	7,21	X	C
Linalool	7,48	X	P
Benzeneethanol	7,91	X	P
1-[2-(2-Methylbutyl)phenyl]ethanone	11,37	X	P
REPLICA #2			
COMPUESTO	TIEMPO	C2CONUV	R2SC
Ethanol	1,52	X	X
Peracetic Acid	1,72	X	P
Butanal, 3-methyl-	1,91	X	C
2-Pentanol	2,23	X	P
2-Isopropoxyethylamine	2,37	X	X
2,3-Butanediol	2,5	X	P

2,4 PENTADIENAL	2,66	X	P
(3R)-3-Phenyl-2,3-dihydro-1H-isoindol	2,88	X	P
2-Hexanone, 4-methyl- (	4,29	X	P
Benzaldehyde	4,8	X	C
9-(Methylthio)-8H-acenaphtho[1,2-c]pyrrole-7-carboxylic Acid	5,25	X	P
Benzeneacetaldehyde	6,36	X	P
: Benzeneacetaldehyde	6,37	X	X
Ethanone, 1-phenyl-	6,86	X	X
benzophenone	6,98	X	X
Benzaldehyde, 4-methyl-	7,21	X	C
Linalool	7,48	X	P
Benzeneethano	7,91	X	P
1-[2-(2-Methylbutyl)phenyl]ethanone	11,37	X	P
REPLICA #3			
COMPUESTO	TIEMPO	C3CONUV	R3SC
Ethanol	1,52	X	X
Peracetic Acid	1,72	X	P
Butanal, 3-methyl-	1,91	X	C
: 2-Pentanol	2,23	X	P
2,3-Butanediol	2,5	X	P
2,4 PENTADIENAL	2,66	X	P
(3R)-3-Phenyl-2,3-dihydro-1H-isoindol	2,88	X	P
2-Hexanone, 4-methyl- (	4,29	X	P
Benzaldehyde	4,8	X	C
9-(Methylthio)-8H-acenaphtho[1,2-c]pyrrole-7-carboxylic Acid	5,25	X	P
: Benzeneacetaldehyde	6,37	X	P
: Benzeneacetaldehyde	6,37	X	X
<u>Ethanone, 1-phenyl-</u>	6,86	X	X
benzophenone	6,98	X	X
Benzaldehyde, 4-methyl-	7,21	X	C
Linalool	7,48	X	P
Benzeneethano	7,91	X	P
1-[2-(2-Methylbutyl)phenyl]ethanone	11,37	X	P
REPLICA #4			
COMPUESTO	TIEMPO	C1CONUV	R4SC

Ethanol	1,52	X	X
Acetic acid	1,7	X	P
FORMAMIDINE ACETATE	1,72	X	X
Butanal, 3-methyl	1,91	X	P
PROPENE 3,3,3-D3	2,23	X	P
Benzaldehyde	4,9	X	C
Benzeneacetaldehyde	6,37	X	X
Hexadecane	9,9	X	P
1-Pentanol, 3-methyl	12,6	X	P
2-Propyldecan-1-ol	17,4	X	P
Heptadecane, 2-methyl-	19,03	X	P
REPLICA #5			
COMPUESTO	TIEMPO	C2CONUV	R5SC
Ethanol	1,52	X	X
Acetic acid	1,7	X	P
FORMAMIDINE ACETATE	1,72	X	X
Butanal, 3-methyl	1,91	X	P
PROPENE 3,3,3-D3	2,23	X	P
Benzaldehyde	4,94	X	C
BENZENEACETALDEHYDE	6,4	X	C
Hexadecane	9,9	X	P
1-Pentanol, 3-methyl	12,6	X	P
2-Propyldecan-1-ol	17,4	X	P
Heptadecane, 2-methyl-	19,03	X	P
REPLICA #6			
COMPUESTO	TIEMPO	C3CONUV	R6SC
Ethanol	1,52	X	X
Acetic acid	1,7	X	P
FORMAMIDINE ACETATE	1,72	X	X
Butanal, 3-methyl	1,91	X	P
PROPENE 3,3,3-D3	2,23	X	P
Benzaldehyde	4,94	X	C
BENZENEACETALDEHYDE	6,4	X	C
Hexadecane	9,9	X	P
1-Pentanol, 3-methyl	12,6	X	P
2-Propyldecan-1-ol	18,53	X	P
Heptadecane, 2-methyl-	19,03	X	P

TABLA 6E

**COMPUESTOS AROMÁTICOS IDENTIFICADOS DURANTE EL DIA
1 DE FERMENTACIÓN (*Acetobacter pasteurianus*).**

REPLICA #1			
COMPUESTO	TIEMPO	C1CONUV	R1AP
Acetaldehyde	1,51	X	X
Ethanol	1,52	X	X
ACETIC ACID	1,7	X	P
Peracetic Acid	1,8	X	X
Butanal, 3-methyl	1,87	X	X
Peracetic Acid	1,99	X	X
2-Propanol	2,47	X	X
N-ethyl-1,3-dithioisoindoline	2,89	X	P
2-Pentanol, 3-methyl	3,3	X	P
Benzaldehyde (	4,84	X	C
: α-Hydroxybenzyl nitrile	4,9	X	P
9-(Methylthio)-8H-acenaphtho[1,2-c]pyrrole	5,25	X	P
2-methoxy[1]benzothieno[2,3-c]quinolin-6(5H)-one	5,27	X	P
Benzeneacetaldehyde	6,34	X	X
Acetophenone	6,85	X	P
: Benzaldehyde, 4-methyl	7,2	X	C
: Linalool	7,49	X	X
: α-TERPINOLENE	7,5	X	X
Benzeneethanol	7,89	X	P
2-Octyldodecan-1-ol	12,66	X	X
REPLICA #2			
COMPUESTO	TIEMPO	C2CONUV	R2AP
Acetaldehyde	1,51	X	X
Ethanol	1,52	X	X
ACETIC ACID	1,7	X	P
Peracetic Acid	1,8	X	P
Butanal, 3-methyl	1,87	X	X
Peracetic Acid	1,99	X	X
2-Propanol	2,47	X	X
N-ethyl-1,3-dithioisoindoline	2,89	X	P

2-Pentanol, 3-methyl	3,3	X	P
⋮ Benzaldehyde	4,83	X	C
⋮ α-Hydroxybenzyl nitrile	4,9	X	P
2-methoxy[1]benzothieno[2,3-c]quinolin-6(5H)-one	5,27	X	P
Benzeneacetaldehyde	6,37	X	X
Acetophenone	6,85	X	P
⋮ Benzaldehyde, 4-methyl	7,2	X	C
⋮ α-TERPINOLENE	7,5	X	X
⋮ Linalool	7,49	X	X
Benzeneethanol``	7,9	X	P
2-Octyldodecan-1-ol	12,66	X	X
REPLICA #3			
COMPUESTO	TIEMPO	C3CONUV	R3AP
Acetaldehyde	1,51	X	X
Ethanol	1,52	X	X
Acetic acid,	1,68	X	P
Peracetic Acid	1,8	X	P
⋮ 2-Butanol, 3-methyl- (	2,05	X	X
Peracetic Acid	1,99	X	X
2-Propanol	2,47	X	X
N-ethyl-1,3-dithioisindoline	2,89	X	P
2-Pentanol, 3-methyl	3,3	X	P
Benzaldehyde	4,88	X	C
⋮ α-Hydroxybenzyl nitrile	4,9	X	P
2-methoxy[1]benzothieno[2,3-c]quinolin-6(5H)-one	5,27	X	P
Benzeneacetaldehyde	6,34	X	C
Acetophenone	6,85	X	P
⋮ Benzaldehyde, 4-methyl	7,2	X	C
⋮ α-TERPINOLENE	7,5	X	X
⋮ Linalool	7,49	X	X
Benzeneethanol``	7,9	X	P
2-Octyldodecan-1-ol	12,66	X	X
REPLICA #4			
COMPUESTO	TIEMPO	C1CONUV	R4AP
Ethanol	1,52	X	X
Acetic acid	1,71	X	P
Propanedioic acid	1,83	X	P

1-Methyl-1-methylaminomethyl-4-pentenol	1,87	X	X
Butanal, 3-methyl	1,87	X	X
Butyraldehyde	2,13	X	P
Benzaldehyde (	4,84	X	C
Benzeneacetaldehyde	6,36	X	C
benzophenone	6,86	X	X
Benzaldehyde, 4-methyl	7,27	X	C
LINALOOL	7,49	X	X
1-phenyl-(2,2,2-2H3)ethanone	14,92	X	P
REPLICA #5			
COMPUESTO	TIEMPO	C2CONUV	R5AP
Ethanol	1,52	X	X
Acetic acid	1,71	X	P
Propanedioic acid	1,83	X	P
1-Methyl-1-methylaminomethyl-4-pentenol	1,87	X	X
Butanal, 3-methyl	1,87	X	X
Butyraldehyde	2,13	X	P
Benzaldehyde (	4,84	X	C
Benzeneacetaldehyde	6,36	X	C
benzophenone	6,86	X	X
Benzaldehyde, 4-methyl	7,27	X	C
LINALOOL	7,49	X	X
1-phenyl-(2,2,2-2H3)ethanone	14,92	X	P
REPLICA #6			
COMPUESTO	TIEMPO	C3CONUV	R6AP
Ethanol	1,52	X	X
Acetic acid	1,71	X	P
Propanedioic acid	1,83	X	P
1-Methyl-1-methylaminomethyl-4-pentenol	1,87	X	X
Butanal, 3-methyl	1,87	X	X
Butyraldehyde	2,13	X	P
Benzaldehyde (	4,84	X	C
Benzeneacetaldehyde	6,36	X	C
benzophenone	6,86	X	X
Benzaldehyde, 4-methyl	7,27	X	C
LINALOOL	7,49	X	X
1-phenyl-(2,2,2-2H3)ethanone	14,92	X	P

TABLA 7E

**COMPUESTOS AROMÁTICOS IDENTIFICADOS DURANTE EL DIA
2 DE FERMENTACIÓN (Cándida metapsilosis).**

REPLICA 1			
compuesto	tiempo	C1conUV	C/P
ACETIC ACID	0.884		P
Butanal, 3-methyl- (CAS)	1005	x	P
2-Butanone, 3-hydroxy- (CAS)	1302	x	C
Benzaldehyde (CAS)	4231	x	C
PHENYL ACETALDEHYDE	5948		P
REPLICA 2			
compuesto	tiempo	C1conUV	C/P
ACETIC ACID	1043	x	C
Butanal, 3-methyl- (CAS)	1261	x	C
Butanoic acid (CAS)	2372		P
Benzaldehyde (CAS)	4350	x	C
Neopentylamine	4424		P
REPLICA 3			
compuesto	tiempo	C1conUV	C/P
ACETIC ACID	1147	x	C
2-Butanone, 3-hydroxy- (CAS)	1565	x	C
PHENYL ACETALDEHYDE	6077		P
REPLICA 4			
compuesto	tiempo	C1conUV	C/P
ACETIC ACID	1349	x	C
2-Butanone, 3-hydroxy- (CAS)	1720	x	C
(O-D)ethenol	2121	x	C
PHENYL ACETALDEHYDE	6157		P
REPLICA 5			
compuesto	tiempo	C1conUV	C/P
ACETIC ACID	1131	x	C
Butanal, 3-methyl- (CAS)	1328	x	C
2-Butanone, 3-hydroxy- (CAS)	1556	x	C

(O-D)ethenol	1962	x	c
Benzaldehyde (CAS)	4402	x	c
PHENYL ACETALDEHYDE	6064		p
REPLICA 6			
compuesto	tiempo	C1conUV	C/P
2-Butanone, 3-hydroxy- (CAS)	0.403	x	c
2-Propanol (CAS)	0.870		p
Benzaldehyde (CAS)	3687	x	c
PHENYL ACETALDEHYDE	5578		p

TABLA 8E

**COMPUESTOS AROMÁTICOS IDENTIFICADOS DURANTE EL DIA
2 DE FERMENTACIÓN (Bacillus amyloliquefaciens).**

Replica 1			
compuesto	tiempo	C1conU V	C/P
Benzaldehyde (CAS)	3324	x	c
Benzeneacetaldehyde	5319		p
1,1,3,3,5,5,7,7,9,9,11,11-Dodecamethyl- hexasiloxane	34856	x	c
Replica 2			
compuesto	tiempo	C1conU V	C/P
ACETIC ACID	1036	x	c
Butanal, 3-methyl- (CAS)	1228	x	p
2-Butanone, 3-hydroxy- (CAS)	1468	x	c
Benzaldehyde (CAS)	4348	x	c
Benzeneacetaldehyde	6034		p
Replica 3			
compuesto	tiempo	C1conU V	C/P
ACETIC ACID	1268	x	c
Butanal, 3-methyl- (CAS)	1436	x	p
Pentanal (CAS)	1476		p
(O-D)ethenol	1695		p
Benzaldehyde (CAS)	4840	x	C
PHENYL ACETALDEHYDE	6130		P
Replica 4			
compuesto	tiempo	C1conU V	C/ P
ACETIC ACID	1362	x	C
Butanal, 3-methyl- (CAS)	1552	x	C
2-Butanone, 3-hydroxy- (CAS)	1778	x	C
Benzaldehyde (CAS)	4530	x	C

PHENYL ACETALDEHYDE	6159		P
1,1,3,3,5,5,7,7,9,9,11,11-Dodecamethyl-hexasiloxane	34775		P
Replica 5			
compuesto	tiempo	C1conU V	C/ P
Benzaldehyde (CAS)	3354	x	C
PHENYL ACETALDEHYDE	5353		P
Replica 6			
compuesto	tiempo	C1conU V	C/ P
ACETIC ACID	0.891	x	C
Butanal, 3-methyl- (CAS)	1112		P
2-Propanol (CAS)	1340		P
2-Butanone, 3-hydroxy- (CAS)	1379	x	C
Benzaldehyde (CAS)	4294	x	C
PHENYL ACETALDEHYDE	5997		P

TABLA 9E

**COMPUESTOS AROMÁTICOS IDENTIFICADOS DURANTE EL DIA
2 DE FERMENTACIÓN (*Saccharomyce cerevisaes*).**

Replica 1			
compuesto	tiempo	C1conUV	C/P
ACETIC ACID	1211	x	c
Butanal, 3-methyl- (CAS)	1383	x	p
3,3-Dimethyl-1-(dimethylamino)-2-butanol	1424		p
(O-D)ethenol	1608		p
Benzaldehyde (CAS)	4453	x	c
Benzeneacetaldehyde	6101		p
Replica 2			
compuesto	tiempo	C1conUV	C/P
Dimethyl 4-(tert-Butyl)phthalate	0.803		p
ACETIC ACID	1050	x	c
Butanal, 3-methyl- (CAS)	1234	x	c
3,3-Dimethyl-1-(dimethylamino)-2-butanol	1272		p
2-Butanone, 3-hydroxy- (CAS)	1469	x	p
(O-D)ethenol	1906		p
Benzaldehyde (CAS)	4364	x	c
PHENYL ACETALDEHYDE	6048		p
Replica 3			
compuesto	tiempo	C1conUV	C/P
ACETIC ACID	1304	x	c
Butanal, 3-methyl- (CAS)	1499	x	p
2-Butanone, 3-hydroxy- (CAS)	1721	x	c
(O-D)ethenol	2115		p
3-Buten-2-one, 3-methyl- (CAS)	3937		p
Benzaldehyde (CAS)	4495	x	c
Benzeneacetaldehyde	6134		p

Replica 4			
compuesto	tiempo	C1conUV	C/P
Acetic acid (CAS)	1076	x	c
Butanal, 3-methyl- (CAS)	1268	x	C
2-Butanone, 3-hydroxy- (CAS)	1510	x	C
(O-D)ethenol	1918	x	C
Benzeneacetaldehyde	6051		P
Replica 5			
compuesto	tiempo	C1conUV	C/P
Benzeneacetaldehyde	5373		P
Replica 6			
compuesto	tiempo	C1conUV	C/P
Dimethyl 4-(tert-Butyl)phthalate	1222		P
ACETIC ACID	1460	x	C
Butanal, 3-methyl- (CAS)	1595	x	P
Acetic acid	2670		P
PHENYL ACETALDEHYDE	6176		P

TABLA 10E

**COMPUESTOS AROMÁTICOS IDENTIFICADOS DURANTE EL DIA
2 DE FERMENTACIÓN (Acetobacter ssyzygii).**

Replica 1			
compuesto	tiempo	C1conU V	C/ P
ACETIC ACID	0.875	x	C
Butanal, 3-methyl- (CAS)	1095	x	P
2-Propanol (CAS)	1376	x	C
Formamide (CAS)	1789		P
Benzaldehyde (CAS)	4287	x	C
Benzeneacetaldehyde	5987		P
Replica 2			
compuesto	tiempo	C1conU V	C/ P
Benzaldehyde (CAS)	0.633	x	C
4-Ethynylcyclopentene	2640		P
Replica 3			
compuesto	tiempo	C1conU V	C/ P
ACETIC ACID	0.815	x	c
Butanal, 3-methyl- (CAS)	1032	x	c
Pentanal (CAS)	1073		p
Methyl glyoxal	1259	x	c
2-Propanol (CAS)	1302	x	c
Benzaldehyde (CAS)	4235	x	c
PHENYL ACETALDEHYDE	5954		p
Replica 4			
compuesto	tiempo	C1conU V	C/ P
ACETIC ACID	0.716	x	c
Pentanal (CAS)	0.907		p
2-Butanone, 3-hydroxy- (CAS)	1157	x	c
Ethanol, 2-nitro-	1666	x	c

Benzaldehyde (CAS)	4151	x	c
Replica 5			
compuesto	tiempo	C1conUV	C/P
ACETIC ACID	0.923	x	c
Butanal, 3-methyl- (CAS)	1105	x	c
2-Propanol (CAS)	1330		p
2-Butanone, 3-hydroxy- (CAS)	1361	x	c
Benzaldehyde (CAS)	4273	x	c
PHENYL ACETALDEHYDE	5976		p
Replica 6			
compuesto	tiempo	C1conUV	C/P
Acetic acid	0.764	x	c
Butanal, 3-methyl- (CAS)	0.944	x	c
Pentanal (CAS)	0.983		p
2-Butanone, 3-hydroxy- (CAS)	1209	x	c
Benzaldehyde (CAS)	4188	x	c
PHENYL ACETALDEHYDE	5917		p

TABLA 11E

**COMPUESTOS AROMÁTICOS IDENTIFICADOS DURANTE EL DIA
2 DE FERMENTACIÓN (Acetobacter ghanensis).**

Replica 1			
compuesto	tiempo	C1conU V	C/ P
ACETIC ACID	1042		P
2-Butanone, 3-hydroxy- (CAS)	1475	x	P
(O-D)ethenol	1883		P
Butanoic acid, 3-methyl- (CAS)	2382	x	P
Benzeneacetaldehyde	6035		P
Replica 2			
compuesto	tiempo	C1conU V	C/ P
ACETIC ACID	1081	x	C
2-Propanol (CAS)	1515	x	C
(O-D)ethenol	1963		P
PHENYL ACETALDEHYDE	6060		P
Replica 3			
compuesto	tiempo	C1conU V	C/ P
ACETIC ACID	0.435	x	c
2-Butanone, 3-hydroxy- (CAS)	0.858	x	c
2-Propanol (CAS)	0.890	x	c
Ethanol (CAS)	1324		p
PHENYL ACETALDEHYDE	5780		p
Replica 4			
compuesto	tiempo	C1conU V	C/ P
ACETIC ACID	1100	x	c
(O-D)ethenol	1467		p
Butanoic acid (CAS)	2430		p
Replica 5			

compuesto	tiempo	C1conUV	C/P
heptane-1,2,4,6-tetraene	4869		p
Replica 6			
compuesto	tiempo	C1conUV	C/P
ACETIC ACID	1178	x	c
2-Propanol (CAS)	1573	x	c
(O-D)ethenol	1608		p
Acetaldehyde (CAS)	2080		p
Butanoic acid (CAS)	2478		p
PHENYL ACETALDEHYDE	6083		p

TABLA 12E

**COMPUESTOS AROMÁTICOS IDENTIFICADOS DURANTE EL DIA
4 DE FERMENTACIÓN (*Saccharomyces cerevisiae*).**

REPLICA #1			
COMPUESTO	TIEMPO	C1CONUV	R1BS
Acetic acid	1,71	X	P
Butanal, 3-methyl-	1,84	X	X
Peracetic Acid	1,8	X	X
2-(1-Methyl-1H-2-pyrrolyl)quinoline	2,74	X	C
2-(Dimethylamino)-6,8-dimethylimidazo[1,5-a]- 1,3,5-triazin-4(3H)-one	3,03	X	P
ACETONE-OXIME	3,59	X	P
2-Isopropoxyethylamine	3,79	X	X
2H-Pyran-3,4-dihydro-2-carboxamide	3,79	X	X
Benzaldehyde	4,8	X	C
BENZENEACETALDEHYDE	6,35	X	C
Ethanone, 1-phenyl	6,99	X	X
Phenylvinylacetylene	9,7	X	P
Naphthalene	9,71	X	P
Benzaldehyde	4,8	X	C
2-Methoxy-6-phenyl-6,6a,7,8-tetrahydro-9aH- furo[3,2-c]quinoline	5,55	X	X
Benzeneacetaldehyde	6,35	X	C
Ethanone, 1-phenyl	6,99	X	X
Methyl 2-methylidene-4-phenyl-4-oxobutanoate	6,99	X	X
Benzeneethano	7,91	X	P
Heptadecane, 2-methyl	9,91	X	P
Tridecane	9,73	X	X
Benzeneacetic acid, ethyl ester	11,13	X	P
B-PHENYLETHYL FORMATE	11,41	X	X
Benzeneacetic acid, 2-phenylethyl	11,41	X	P
1-Octanol, 2-butyl-	12,85	X	X
5-Benzoxihexanenitrile	14,92	X	P
Pentadecane	14,98	X	C
Octadecane	16,54	X	X

Dotriacontane	16,74	X	X
1-Undecanol	18,25	X	X
REPLICA #2			
COMPUESTO	TIEMPO	C2CONUV	R2BS
Acetic acid	1,71	X	P
Butanal, 3-methyl-	1,84	X	X
Peracetic Acid	1,8	X	X
2-(1-Methyl-1H-2-pyrrolyl)quinoline	2,74	X	C
2-(Dimethylamino)-6,8-dimethylimidazo[1,5-a]-1,3,5-triazin-4(3H)-one	3,03	X	P
ACETONE-OXIME	3,59	X	P
2-Isopropoxyethylamine	3,79	X	X
2H-Pyran-3,4-dihydro-2-carboxamide	3,79	X	X
Benzaldehyde	4,8	X	C
BENZENEACETALDEHYDE	6,35	X	C
Ethanone, 1-phenyl	6,99	X	X
Phenylvinylacetylene	9,7	X	P
Naphthalene	9,71	X	P
Benzaldehyde	4,8	X	C
2-Methoxy-6-phenyl-6,6a,7,8-tetrahydro-9aH-furo[3,2-c]quinoline	5,55	X	X
Benzeneacetaldehyde	6,35	X	C
Ethanone, 1-phenyl	6,99	X	X
Methyl 2-methylidene-4-phenyl-4-oxobutanoate	6,99	X	X
Benzeneethano	7,91	X	P
Heptadecane, 2-methyl	9,91	X	P
Tridecane	9,73	X	X
Benzeneacetic acid, ethyl ester	11,13	X	P
B-PHENYLETHYL FORMATE	11,41	X	X
Benzeneacetic acid, 2-phenylethyl	11,41	X	P
1-Octanol, 2-butyl-	12,85	X	X
5-Benzoxyhexanenitrile	14,92	X	P
Pentadecane	14,98	X	C
Octadecane	16,54	X	X
Dotriacontane	16,74	X	X
1-Undecanol	18,25	X	X
REPLICA #3			

COMPUESTO	TIEMPO	C3CONUV	R3BS
Acetic acid	1,71	X	P
Butanal, 3-methyl-	1,84	X	X
Peracetic Acid	1,8	X	X
2-(1-Methyl-1H-2-pyrrolyl)quinoline	2,74	X	C
2-(Dimethylamino)-6,8-dimethylimidazo[1,5-a]-1,3,5-triazin-4(3H)-one	3,03	X	P
ACETONE-OXIME	3,59	X	P
2-Isopropoxyethylamine	3,79	X	X
2H-Pyran-3,4-dihydro-2-carboxamide	3,79	X	X
Benzaldehyde	4,8	X	C
BENZENEACETALDEHYDE	6,35	X	C
Ethanone, 1-phenyl	6,99	X	X
Phenylvinylacetylene	9,7	X	P
Naphthalene	9,71	X	P
Benzaldehyde	4,8	X	C
2-Methoxy-6-phenyl-6,6a,7,8-tetrahydro-9aH-furo[3,2-c]quinoline	5,55	X	X
Benzeneacetaldehyde	6,35	X	C
Ethanone, 1-phenyl	6,99	X	X
Methyl 2-methylidene-4-phenyl-4-oxobutanoate	6,99	X	X
Benzeneethano	7,91	X	P
Heptadecane, 2-methyl	9,91	X	P
Tridecane	9,73	X	X
Benzeneacetic acid, ethyl ester	11,13	X	P
B-PHENYLETHYL FORMATE	11,41	X	X
Benzeneacetic acid, 2-phenylethyl	11,41	X	P
1-Octanol, 2-butyl-	12,85	X	X
5-Benzoxyhexanenitrile	14,92	X	P
Pentadecane	14,98	X	C
Octadecane	16,54	X	X
Dotriacontane	16,74	X	X
1-Undecanol	18,25	X	X
REPLICA #4			
COMPUESTO	TIEMPO	C1CONUV	R4BS
ACETIC ACID	1,58	X	C
3E)-[(Trimethylsilyl)methylidene]octahydroinden-4-one	2,87	X	X

(3R)-3-Phenyl-2,3-dihydro-1H-isoindol-1-one	2,87	X	X
Ethanol, 2-methoxy-, acetate (CAS)	3,59	X	P
3-Penten-2-ol	3,67	X	P
Benzaldehyde	4,85	X	C
Benzeneacetaldehyde	6,37	X	P
Ethanone, 2,2-dihydroxy-1-phenyl-	6,99	X	C
Benzeneethanol	7,99	X	P
Naphthalene	9,7	X	P
Phenylvinylacetylene	9,7	X	X
2-Methyl-3-phenylpropanoic acid	11,13	X	X
1-phenyl-5-ethyl-nona-3,4-dien-2-one	11,13	X	P
Pentanal, 4-(benzoyloxy	14,92	X	P
: Caffeine	24,73	X	P
REPLICA #5			
COMPUESTO	TIEMPO	C2CONUV	R5BS
ACETIC ACID	1,58	X	C
3E)-[(Trimethylsilyl)methylidene]octahydroinden-4-one	2,87	X	X
(3R)-3-Phenyl-2,3-dihydro-1H-isoindol-1-one	2,87	X	X
Ethanol, 2-methoxy-, acetate (CAS)	3,59	X	P
3-Penten-2-ol	3,67	X	P
Benzaldehyde	4,85	X	C
Benzeneacetaldehyde	6,37	X	P
Ethanone, 2,2-dihydroxy-1-phenyl-	6,99	X	C
Benzeneethanol	7,99	X	P
Naphthalene	9,7	X	P
Phenylvinylacetylene	9,7	X	X
2-Methyl-3-phenylpropanoic acid	11,13	X	X
1-phenyl-5-ethyl-nona-3,4-dien-2-one	11,13	X	P
Pentanal, 4-(benzoyloxy	14,92	X	P
: Caffeine	24,73	X	P
REPLICA #6			
COMPUESTO	TIEMPO	C3CONUV	R6BS
ACETIC ACID	1,58	X	C
3E)-[(Trimethylsilyl)methylidene]octahydroinden-4-one	2,87	X	X
(3R)-3-Phenyl-2,3-dihydro-1H-isoindol-1-one	2,87	X	X

Ethanol, 2-methoxy-, acetate (CAS)	3,59	X	P
3-Penten-2-ol	3,67	X	P
Benzaldehyde	4,85	X	C
Benzeneacetaldehyde	6,37	X	P
Ethanone, 2,2-dihydroxy-1-phenyl-	6,99	X	C
Benzeneethanol	7,99	X	P
Naphthalene	9,7	X	P
Phenylvinylacetylene	9,7	X	X
2-Methyl-3-phenylpropanoic acid	11,13	X	X
1-phenyl-5-ethyl-nona-3,4-dien-2-one	11,13	X	P
Pentanal, 4-(benzoyloxy	14,92	X	P
: Caffeine	24,73	X	P

TABLA 13E

**COMPUESTOS AROMÁTICOS IDENTIFICADOS DURANTE EL
DIA 3 DE FERMENTACIÓN (*Acetobacter ghanensis*).**

Replica 1			
compuesto	tiempo	C1conU V	C/P
Ethanol	1254	x	c
Ethyl Acetate	1491		p
(O-D)ethenol	1756	x	c
1Butanol, 3methyl (impure) (CAS)	1945	x	c
Benzeneethanol (CAS)	7919	x	p
Decanoic acid, ethyl ester (CAS)	14896		p
Replica 2			
compuesto	tiempo	C1conU V	C/P
Ethanol	1444	x	c
Acetic acid	1582		p
Ethyl Acetate	1669		p
α -Hydroperoxy diethyl ether	1758	x	c
1-Butanol, 3-methyl- (impure) (CAS)	2108	x	c
Benzeneethanol (CAS)	7901	x	c
Decanoic acid, ethyl ester (CAS)	14879		p
Replica 3			
compuesto	tiempo	C1conU V	C/P
Ethanol	1415	x	c
Acetic acid, ethyl ester (CAS)	1638	x	c
α -Hydroperoxy diethyl ether	1692	x	c
1-Butanol, 3-methyl- (impure)	2079	x	c
Benzeneethanol (CAS)	7908	x	c
Decanoic acid, ethyl ester (CAS)	14885		p
Replica 4			

compuesto	tiempo	C1conUV	C/P
Ethanol	0.933	x	c
ACETIC ACID	0.993		p
Ethyl Acetate	1079		p
Acetic acid, ethyl ester (CAS)	1167	x	c
1-Butanol, 3-methyl- (impure)	1557	x	c
Benzeneethanol (CAS)	7955	x	c
Replica 5			
compuesto	tiempo	C1conUV	C/P
Ethanol	1353	x	c
Ethyl Acetate	1640		p
1-Pentanol (CAS)	2026		p
Benzeneethanol (CAS)	7917	x	c
malonamic acid	14881		p
Replica 6			
compuesto	tiempo	C1conUV	C/P
Ethanol (CAS)	1238	x	c
1-Butanol, 3-methyl- (impure) (	1915	x	c
Benzeneethanol (CAS)	7769	x	c
Decanoic acid, ethyl ester (CAS)	14871		p

TABLA 14E

**COMPUESTOS AROMÁTICOS IDENTIFICADOS DURANTE EL
DIA 3 DE FERMENTACIÓN (Lactobacillus fermentum).**

Replica 1			
compuesto	tiempo	C1conU V	C/P
Ethanol	1551		p
α -Hydroperoxy diethyl ether	1805	x	c
4,5-Dimethyl-1,3-dioxolan-2-one	1902		p
1-Butanol, 3-methyl- (impure) (CAS)	2230		p
PROPENE 3,3,3-D3	2319		p
1,5E,7-octatrien-3-yne			p
Benzeneethanol (CAS)	7900	x	c
Hexadecanoic acid, ethyl ester (CAS)	9843		p
Decanoic acid, ethyl ester (CAS)	14882		p
1,1,3,3,5,5,7,7,9,9,11,11-dodecamethylhexasiloxane	34825		p
Replica 2			
compuesto	tiempo	C1conU V	C/P
Ethanol	1537	x	c
α -Hydroperoxy diethyl ether	1763	x	c
1-Butanol, 3-methyl- (impure) (CAS)	2195	x	c
PROPENE 3,3,3-D3	2310		p
1,5E,7-octatrien-3-yne	3773		p
Ethyl 4-Methylheptanoate	9843	x	p
Decanoic acid, ethyl ester (CAS)	14881		p
1,1,3,3,5,5,7,7,9,9,11,11-dodecamethylhexasiloxane	33760		p
Replica 3			
compuesto	tiempo	C1conU V	C/P

Ethanol (CAS)	1552	x	p
α -Hydroperoxy diethyl ether	1905		p
Hexadecane (CAS)	5332	x	c
2,4,6,8-Tetramethyl-1-undecene	7109	x	c
Benzeneethanol (CAS	7896		p
Ethyl 4-Methylheptanoate	9839		p
Decanoic acid, ethyl ester (CAS	14876		p
branched - heptadecane	18574	x	c
Replica 4			
compuesto	tiempo	C1conUV	C/P
Ethanol	1558		p
Ethanol, 2-nitro- (CAS)	1691	x	c
Acetic acid, ethyl ester (CAS	1778	x	c
α -Hydroperoxy diethyl ether	1901	x	c
1-Butanol, 3-methyl- (impure) (CAS)	2232	x	c
Benzeneethanol (CAS)	7895	x	p
1-[2-(2-Methylbutyl)phenyl]ethanone	11356		p
Decanoic acid, ethyl ester (CAS)	14879		p
Replica 5			
compuesto	tiempo	C1conUV	C/P
Ethanol	1588	x	c
Ethanol, 2-nitro- (CAS)	1715	x	c
α -Hydroperoxy diethyl ether	1764	x	c
4,5-Dimethyl-1,3-dioxolan-2-one	1801		p
1-Butanol, 3-methyl- (impure) (CAS)	2226	x	c
Benzeneethanol (CAS)	7900	x	c
1-[2-(2-Methylbutyl)phenyl]ethanone	11353		p
Decanoic acid, ethyl ester (CAS	14880		p
Butane, 2,2-dimethyl- (CAS)	16533		p
Replica 6			
compuesto	tiempo	C1conUV	C/P
Ethanol	1564	x	p

4,5-Dimethyl-1,3-dioxolan-2-one	1919		p
1-Butanol, 3-methyl- (impure) (CAS	2239	x	c
Decanoic acid, ethyl ester (CAS)	14877		p
Hexadecane (CAS)	14980	x	c
Butane, 2,2-dimethyl- (CAS)	16536		p

TABLA 15E

**COMPUESTOS AROMÁTICOS IDENTIFICADOS DURANTE
EL DIA 3 DE FERMENTACIÓN (Lactobacillus nagelii).**

Replica 1			
compuesto	tiempo	C1conUV	C/P
Ethanol	1563		p
Ethanol, 2-nitro- (CAS)	1702	x	p
Acetic acid, ethyl ester (CAS)	1781	x	c
α -Hydroperoxy diethyl ether	1807	x	p
1-Butanol, 3-methyl- (impure) (CAS)	2232	x	p
5,6-BIS(METHYLIDENE)-2-NORBORNEN-7-ONE	3771		p
Benzeneethanol (CAS)	7899	x	c
Octanoic acid, ethyl ester (CAS)	9855		p
Replica 2			
compuesto	tiempo	C1conUV	C/P
Ethanol	1568	x	c
α -Hydroperoxy diethyl ether	1786	x	c
5,6-BIS(METHYLIDENE)-2-NORBORNEN-7-ONE	3775	x	p
Benzeneethanol (CAS)	7898	x	p
Octanoic acid, ethyl ester (CAS)	9848		p
Decanoic acid, ethyl ester (CAS)	14884		p
Replica 3			
compuesto	tiempo	C1conUV	C/P
Ethanol (CAS)	1699	x	c
α -Hydroperoxy diethyl ether	1909		p
1-Butanol, 3-methyl- (impure) (CAS)	2328	x	p
5,6-BIS(METHYLIDENE)-2-NORBORNEN-7-ONE	3774		P

Decanoic acid, ethyl ester (CAS	14890		P
Replica 4			
compuesto	tiempo	C1conUV	C/P
Ethanol	1575		p
Ethanol, 2-nitro- (CAS)	1713	x	p
1-Butanol, 3-methyl- (impure) (CAS)	2324	x	p
5,6-BIS(METHYLIDENE)-2-NORBORNEN-7-ONE	3773		p
PHENYL ACETALDEHYDE	6356	x	p
Octanoic acid, ethyl ester (CAS)	9845		p
Decanoic acid, ethyl ester (CAS)	14881		p
Replica 5			
compuesto	tiempo	C1conUV	C/P
Ethanol (CAS)	1693	x	c
Ethanol, 2-nitro- (CAS)	1732	x	c
α -Hydroperoxy diethyl ether	1900	x	c
1-Butanol, 3-methyl- (impure) (CAS)	2249	x	p
5,6-BIS(METHYLIDENE)-2-NORBORNEN-7-ONE	3772	x	p
Benzeneethanol (CAS)	7902	x	p
Octanoic acid, ethyl ester (CAS)	9842		p
Replica 6			
compuesto	tiempo	C1conUV	C/P
Ethanol	1328	x	p
1-Butanol, 3-methyl- (impure) (CAS)	1999	x	c
Benzeneethanol (CAS)	7907	x	c
Decanoic acid, ethyl ester (CAS)	14886		p

TABLA 16E

COMPUESTOS AROMÁTICOS IDENTIFICADOS DURANTE EL DIA 3 DE FERMENTACIÓN (*Saccharomyce cerevisaes*).

Replica 1			
compuesto	tiempo	C1conUV	C/P
Ethanol	1455		P
Acetic acid, ethyl ester (CAS)	1677	x	C
α -Hydroperoxy diethyl ether	1752	x	C
1-Butanol, 3-methyl- (impure) (CAS)	2184	x	C
Hexadecanoic acid, ethyl ester (CAS)	9858		P
Replica 2			
compuesto	tiempo	C1conUV	C/P
Ethanol	1257	x	C
Acetic acid, ethyl ester (CAS)	1484	x	C
1-Butanol, 3-methyl- (impure) (CAS)	1934	x	C
Benzeneethanol (CAS)	7904		P
Hexadecanoic acid, ethyl ester (CAS)	9854		P
Decanoic acid, ethyl ester (CAS)	14876		P
Replica 3			
compuesto	tiempo	C1conUV	C/P
Ethanol	1551	x	C
Ethanol, 2-nitro- (CAS)	1707	x	C
α -Hydroperoxy diethyl ether	1795		P
1-Butanol, 3-methyl- (impure) (CAS)	2223	x	C
Benzeneethanol (CAS)	7898	x	C
Decanoic acid, ethyl ester (CAS)	14881		P
Replica 4			
compuesto	tiempo	C1conUV	C/P

Ethanol	1063		P
1-Butanol, 3-methyl- (impure) (CAS)	1765	x	c
Replica 5			
compuesto	tiempo	C1conUV	C/P
Ethanol	1144	X	c
Acetic acid, ethyl ester (CAS)	1375	X	c
1-Butanol, 3-methyl- (impure) (CAS)	1919	X	c
Benzeneethanol (CAS)	7912	X	c
Replica 6			
compuesto	tiempo	C1conUV	C/P
Ethanol	1435	X	c
Acetic acid, ethyl ester (CAS)	1662	X	c
α -Hydroperoxy diethyl ether	1758		p
1-Butanol, 3-methyl- (impure) (CAS)	2186	X	c
Benzeneethanol (CAS)	7912	X	c

TABLA 17E

**COMPUESTOS AROMÁTICOS IDENTIFICADOS DURANTE
EL DIA 4 DE FERMENTACIÓN (*Candida metapsilosis*).**

REPLICA #1			
COMPUESTO	TIEMPO	C1CONUV	R1CM
Ethanol	1,46	X	X
Acetic acid	1,7	X	C
3-Penten-2-ol	3,68	X	P
DL-1,3-DIMETHOXYHEXANE	3,69	X	X
Benzaldehyde	4,82	X	C
PHENYL ACETALDEHYDE	6,39	X	X
Benzeneacetaldehyde	6,4	X	P
benzophenone	6,85	X	X
Ethyl 2-cyano-3-phenylbutenoate	7,12	X	X
2-Decyloxyethanol	7,5	X	X
Benzeneethanol	7,92	X	P
2-Phenylbut-3-yn-1-ene	9,71	X	X
[N-(Benzyloxycarbonyl)- α -methylisoserine]phenylalanine tert-butyl ester	11,12	X	X
B-PHENYLETHYL FORMATE	11,4	X	C
Hexadecane	15,02	X	C
REPLICA #2			
COMPUESTO	TIEMPO	C2CONUV	R2CM
Ethanol	1,56	X	C
Acetic acid	1,7	X	C
3-Penten-2-ol	3,67	X	P
DL-1,3-DIMETHOXYHEXANE	3,69	X	X
Benzaldehyde	4,82	X	C
PHENYL ACETALDEHYDE	6,39	X	X
Benzeneacetaldehyde	6,4	X	P
Benzophenone	6,85	X	X
Ethyl 2-cyano-3-phenylbutenoate	7,12	X	X
2-Decyloxyethanol	7,5	X	X
Benzeneethanol	7,92	X	P

2-Phenylbut-3-yn-1-ene	9,71	X	X
[N-(Benzyloxycarbonyl)- α -methylisoserine]phenylalanine tert-butyl ester	11,12	X	X
B-PHENYLETHYL FORMATE	11,4	X	C
Hexadecane	15,02	X	C
REPLICA #3			
COMPUESTO	TIEMPO	C2CONUV	R3CM
Ethanol	1,45	X	X
Acetic acid	1,7	X	C
3-Penten-2-ol	3,69	X	P
DL-1,3-DIMETHOXYHEXANE	3,69	X	X
Benzaldehyde	4,82	X	C
PHENYL ACETALDEHYDE	6,39	X	X
Benzeneacetaldehyde	6,4	X	P
benzophenone	6,85	X	X
Ethyl 2-cyano-3-phenylbutenoate	7,12	X	X
2-Decyloxyethanol	7,5	X	X
Benzeneethanol	7,92	X	P
2-Phenylbut-3-yn-1-ene	9,71	X	X
[N-(Benzyloxycarbonyl)- α -methylisoserine]phenylalanine tert-butyl ester	11,12	X	X
B-PHENYLETHYL FORMATE	11,4	X	C
Hexadecane	15,02	X	C
REPLICA #4			
COMPUESTO	TIEMPO	C1CONUV	R4CM
Ethanol	1,51	X	C
Acetic acid	1,68	X	C
Benzaldehyde	4,8	X	C
Benzeneacetaldehyde	6,49	X	P
Ethanone, 1-phenyl-	7	X	X
Phenylethyl Alcohol	7,9	X	C
ETHYLPHENYL ACETATE	11,12	X	C
B-PHENYLETHYL FORMATE	11,44	X	C
1-phenyl-(2,2,2- H_3)ethanone	14,91	X	X
Neopentyl hydroxyacetate	19,43	X	X
3-benzylidene-2-(p-methylphenyl)sulfonylamino-1-methylindoline	22,91	X	X

REPLICA #5			
COMPUESTO	TIEMPO	C2CONUV	R5CM
Ethanol	1,51	X	C
Acetic acid	1,68	X	C
Benzaldehyde	4,8	X	C
Benzeneacetaldehyde	6,49	X	P
Ethanone, 1-phenyl-	7	X	X
Phenylethyl Alcohol	7,9	X	C
ETHYLPHENYL ACETATE	11,12	X	C
B-PHENYLETHYL FORMATE	11,44	X	C
1-phenyl-(2,2,2-2H3)ethanone	14,91	X	X
Neopentyl hydroxyacetate	19,43	X	X
3-benzylidene-2-(p-methylphenyl)sulfonylamino-1-methylindoline	22,91	X	X
REPLICA #6			
COMPUESTO	TIEMPO	C3CONUV	R6CM
Ethanol	1,51	X	C
Acetic acid	1,72	X	C
1-Pentanol, 2-methyl-	3,4	X	X
Benzaldehyde	5	X	C
Benzeneacetaldehyde	6,48	X	P
Ethanone, 1-phenyl-	7	X	X
Phenylethyl Alcohol	7,9	X	C
ETHYLPHENYL ACETATE	11,12	X	C
B-PHENYLETHYL FORMATE	11,44	X	C
1-phenyl-(2,2,2-2H3)ethanone	14,91	X	X
Neopentyl hydroxyacetate	19,43	X	X
3-benzylidene-2-(p-methylphenyl)sulfonylamino-1-methylindoline	22,91	X	X

TABLA 18E

**COMPUESTOS AROMÁTICOS IDENTIFICADOS DURANTE EL DIA
4 DE FERMENTACIÓN (*Acetobacter ghanensis*)**

REPLICA #1			
COMPUESTO	TIEMPO	C1CONUV	R1AG
ACETIC ACID	1,48	X	P
(3S)-3-Phenyl-2,3-dihydro-1H-isoindol-1-one	2,83	X	P
2-Naphthalene-sulfonic acid	2,85	X	P
Benzaldehyde	4,85	X	X
BENZENEACETALDEHYDE	6,5	X	C
Ethanone, 2,2-dihydroxy-1-phenyl-	7,07	X	X
Benzeneethanol	7,97	X	P
Naphthalene	9,07	X	P
5-Benzoyloxypentanal	14,93	X	X
Pentadecane	11,05	X	C
REPLICA #2			
COMPUESTO	TIEMPO	C2CONUV	R2AG
ACETIC ACID	1,48	X	P
(3S)-3-Phenyl-2,3-dihydro-1H-isoindol-1-one	2,83	X	P
2-Naphthalene-sulfonic acid	2,85	X	P
Benzaldehyde	5	X	X
BENZENEACETALDEHYDE	6,5	X	X
Ethanone, 2,2-dihydroxy-1-phenyl-	7,07	X	X
Benzeneethanol	7,97	X	P
Naphthalene	9,07	X	P
5-Benzoyloxypentanal	14,93	X	X
Pentadecane	11,05	X	X
REPLICA #3			
COMPUESTO	TIEMPO	C3CONUV	R3AG
ACETIC ACID	1,48	X	P
(3S)-3-Phenyl-2,3-dihydro-1H-isoindol-1-one	2,83	X	P
2-Naphthalene-sulfonic acid	2,85	X	P
Benzaldehyde	5	X	X
BENZENEACETALDEHYDE	6,5	X	X
Ethanone, 2,2-dihydroxy-1-phenyl-	7,07	X	X

Benzeneethanol	7,97	X	P
Naphthalene	9,07	X	P
5-Benzoyloxypentanal	14,93	X	X
Pentadecane	11,05	X	X
REPLICA #4			
COMPUESTO	TIEMPO	C1CONUV	R4AG
Ethanol	1,56	X	C
Acetic acid	1,68	X	C
2-Naphthalene-sulfonic acid	2,89	X	X
Ethanol, 2-methoxy-, acetate	3,37	X	P
Benzaldehyde	5	X	C
PHENYL ACETALDEHYDE	6,5	X	C
Benzeneethanol	8	X	P
N-(Benzyloxycarbonyl)- α -methylisoserine]phenylalanine tert-butyl	8,26	X	X
Acetic acid, 2-phenylethyl ester (CAS)	11,42	X	C
Caffeine	24	X	X
Pentadecane	11,05	X	X
1-Tridecanol	13,04	X	X
Pentanal, 4-(benzoyloxy)-	14,91	X	P
REPLICA #5			
COMPUESTO	TIEMPO	C2CONUV	R5AG
Ethanol	1,56	X	C
Acetic acid	1,68	X	C
2-Naphthalene-sulfonic acid	2,89	X	X
Ethanol, 2-methoxy-, acetate	3,37	X	P
Benzaldehyde	5	X	C
PHENYL ACETALDEHYDE	6,5	X	C
Benzeneethanol	8	X	P
N-(Benzyloxycarbonyl)- α -methylisoserine]phenylalanine tert-butyl	8,26	X	X
Acetic acid, 2-phenylethyl ester (CAS)	11,42	X	C
Caffeine	24	X	X
Pentadecane	11,05	X	X
1-Tridecanol	13,04	X	X
Pentanal, 4-(benzoyloxy)-	14,91	X	P
REPLICA #6			

COMPUESTO	TIEMPO	C3CONUV	R6AG
Ethanol	1,56	X	C
Acetic acid	1,68	X	C
2-Naphthalene-sulfonic acid	2,89	X	X
Ethanol, 2-methoxy-, acetate	3,37	X	P
Benzaldehyde	4,89	X	C
PHENYL ACETALDEHYDE	6,5	X	C
Benzeneethanol	7,99	X	P
N-(Benzyloxycarbonyl)- α -methylisoserine]phenylalanine tert-butyl	8,26	X	X
Acetic acid, 2-phenylethyl ester (CAS)	11,42	X	C
Caffeine	24	X	X
Pentadecane	11,05	X	X
1-Tridecanol	13,04	X	X
Pentanal, 4-(benzoyloxy)-	14,91	X	P

TABLA 19E

**COMPUESTOS AROMÁTICOS IDENTIFICADOS DURANTE EL DIA
4 DE FERMENTACIÓN (*Acetobacter pasteurianus*)**

REPLICA #1			
COMPUESTO	TIEMPO	C1CONUV	R1AP
Ethanol	1,49	X	P
ACETIC ACID	1,66	X	C
N-ethyl-1,3-dithioisoindoline	2,88	X	C
(3R)-3-Phenyl-2,3-dihydro-1H-isoindol-1-one	2,88	X	C
2-Naphthalene-sulfonic acid	2,99	X	P
Benzaldehyde	4,8	X	X
Benzeneacetaldehyde	6,37	X	X
Ethanone, 2,2-dihydroxy-1-phenyl-	7,07	X	X
Benzeneethanol	7,99	X	X
3-(2-Methylphenoxy)-3-methoxypropyne	9,7	X	X
ETHYLPHENYL ACETATE	11,12	X	P
[N-(Benzyloxycarbonyl)- α -methylisoserine]phenylalanine	11,13	X	X
1-phenyl-5-ethyl-nona-3,4-dien-2-one	11,38	X	X
B-PHENYLETHYL FORMATE	11,42	X	X
1-phenyl-(2,2,2- H_3)ethanone	14,9	X	P
REPLICA #2			
COMPUESTO	TIEMPO	C2CONUV	R2AP
Ethanol	1,49	X	P
ACETIC ACID	1,66	X	C
N-ethyl-1,3-dithioisoindoline	2,88	X	C
(3R)-3-Phenyl-2,3-dihydro-1H-isoindol-1-one	2,88	X	C
2-Naphthalene-sulfonic acid	2,99	X	P
Benzaldehyde	4,8	X	X
Benzeneacetaldehyde	6,37	X	X
Ethanone, 2,2-dihydroxy-1-phenyl-	7,07	X	X
Benzeneethanol	7,99	X	X
3-(2-Methylphenoxy)-3-methoxypropyne	9,7	X	X
ETHYLPHENYL ACETATE	11,12	X	P
[N-(Benzyloxycarbonyl)- α -methylisoserine]phenylalanine	11,13	X	X

1-phenyl-5-ethyl-nona-3,4-dien-2-one	11,38	X	X
B-PHENYLETHYL FORMATE	11,42	X	X
1-phenyl-(2,2,2-2H3)ethanone	14,9	X	P
REPLICA #3			
COMPUESTO	TIEMPO	C3CONUV	R3AP
Ethanol	1,49	X	X
ACETIC ACID	1,66	X	C
N-ethyl-1,3-dithioisindoline	2,88	X	X
(3R)-3-Phenyl-2,3-dihydro-1H-isindol-1-one	2,88	X	X
2-Naphthalene-sulfonic acid	2,99	X	P
Benzaldehyde	5	X	C
Benzeneacetaldehyde	6,37	X	C
Ethanone, 2,2-dihydroxy-1-phenyl-	7,07	X	C
Benzeneethanol	7,99	X	P
3-(2-Methylphenoxy)-3-methoxypropyne	9,7	X	X
ETHYLPHENYL ACETATE	11,12	X	X
[N-(Benzyloxycarbonyl)- α -methylisoserine]phenylalanine	11,13	X	X
1-phenyl-5-ethyl-nona-3,4-dien-2-one	11,38	X	X
B-PHENYLETHYL FORMATE	11,42	X	X
1-phenyl-(2,2,2-2H3)ethanone	14,9	X	P
REPLICA #4			
COMPUESTO	TIEMPO	C1CONUV	R4AP
Ethanol	1,46	X	X
Acetic acid	1,44	X	C
N-ethyl-1,3-dithioisindoline	1,97	X	X
2-Naphthalene-sulfonic acid	2,86	X	P
3-Penten-2-ol	4,8	X	X
BENZENEACETALDEHYDE	5,37	X	X
2-(2-Methylpiperidino)ethyl o-chlorobenzoate	6,98	X	X
1-(4'-Nitrophenyl)-3-phenyl-4,5-dihydro-5-oxopyrazole	7	X	X
Benzeneacetaldehyde	7,2	X	C
Phenol, 2-methoxy-	7,38	X	P
Benzeneethanol	7,85	X	P
3-Methyl-28-nor-3,4-seco-5 α -lanosta-4,8-dien-3-one	8,77	X	P
2-Ethyl-2,5-dimethylcyclopent-2-enone	9,84	X	P

N-β-phenyl-ethyl-trifluoroacetamide	11,41	X	P
ETHYLPHENYL ACETATE	11,12	X	C
(Z)-But-2-enyl benzoate	11,44	X	X
REPLICA #5			
COMPUESTO	TIEMPO	C2CONUV	R5AP
Ethanol	1,49	X	X
Acetic acid	1,67	X	C
N-ethyl-1,3-dithioisoindoline	2,88	X	X
2-Naphthalene-sulfonic acid	2,86	X	P
3-Penten-2-ol	3,67	X	X
Benzaldehyde,	5,27	X	X
2-(2-Methylpiperidino)ethyl o-chlorobenzoate	4,77	X	X
1-(4'-Nitrophenyl)-3-phenyl-4,5-dihydro-5-oxopyrazole	5,35	X	X
Benzeneacetaldehyde	6,37	X	C
Phenol, 2-methoxy-	7,38	X	P
Benzeneethanol	7,85	X	P
3-Methyl-28-nor-3,4-seco-5α-lanosta-4,8-dien-3-one	8,77	X	P
2-Ethyl-2,5-dimethylcyclopent-2-enone	9,84	X	P
N-β-phenyl-ethyl-trifluoroacetamide	11,41	X	P
ETHYLPHENYL ACETATE	11,12	X	C
(Z)-But-2-enyl benzoate	14,89	X	X
REPLICA #6			
COMPUESTO	TIEMPO	C3CONUV	R6AP
Ethanol	1,49	X	X
Acetic acid	1,67	X	C
N-ethyl-1,3-dithioisoindoline	2,88	X	X
2-Naphthalene-sulfonic acid	2,86	X	P
3-Penten-2-ol	3,67	X	X
Benzaldehyde,	5,27	X	X
2-(2-Methylpiperidino)ethyl o-chlorobenzoate	4,77	X	X
1-(4'-Nitrophenyl)-3-phenyl-4,5-dihydro-5-oxopyrazole	5,35	X	X
Benzeneacetaldehyde	6,37	X	C
Phenol, 2-methoxy-	7,38	X	P
Benzeneethanol	7,93	X	P
3-Methyl-28-nor-3,4-seco-5α-lanosta-4,8-dien-3-	8,77	X	P

one			
2-Ethyl-2,5-dimethylcyclopent-2-enone	9,84	X	P
N-β-phenyl-ethyl-trifluoroacetamide	11,41	X	P
ETHYLPHENYL ACETATE	11,12	X	C
(Z)-But-2-enyl benzoate	14,89	X	X

TABLA 20E

**COMPUESTOS AROMÁTICOS IDENTIFICADOS DURANTE EL DIA
4 DE FERMENTACIÓN (*Bacillus amyloliquefaciens*).**

REPLICA #1			
COMPUESTO	TIEMPO	C1CONUV	R1BA
Ethanol	1,46	X	C
Acetic acid	1,68	X	C
N-ethyl-1,3-dithioisoindoline	2,88	X	C
3-Penten-2-ol	3,68	X	C
Benzaldehyde	4,81	X	C
BENZENEACETALDEHYDE	6,38	X	X
benzophenone	7	X	C
Benzeneethanol	7,91	X	P
ETHYLPHENYL ACETATE	11,13	X	C
B-PHENYLETHYL FORMATE	11,42	X	C
REPLICA #2			
COMPUESTO	TIEMPO	C2CONUV	R2BA
Ethanol	1,457	X	C
Acetic acid	1,68	X	C
N-ethyl-1,3-dithioisoindoline	2,88	X	C
3-Penten-2-ol	3,68	X	C
Benzaldehyde	4,85	X	C
BENZENEACETALDEHYDE	6,37	X	C
benzophenone	7	X	C
Benzeneethanol	7,91	X	P
ETHYLPHENYL ACETATE	11,12	X	C
B-PHENYLETHYL FORMATE	11,42	X	C
REPLICA #3			
COMPUESTO	TIEMPO	C3CONUV	R3BA
Ethanol	1,457	X	C
Acetic acid	1,68	X	C
N-ethyl-1,3-dithioisoindoline	2,88	X	C
3-Penten-2-ol	3,69	X	X
Benzaldehyde	4,8	X	C

PHENYL ACETALDEHYDE	6,37	X	C
benzophenone	6,85	X	C
Benzeneethanol	7,91	X	P
ETHYLPHENYL ACETATE	11,12	X	C
B-PHENYLETHYL FORMATE	11,42	X	C
REPLICA #4			
COMPUESTO	TIEMPO	C1CONUV	R4BA
Ethanol	1,457	X	C
Acetic acid	1,68	X	C
1-Pentanol, 2-methyl-	3,4	X	C
Benzaldehyde	4,84	X	C
BENZENEACETALDEHYDE	6,29	X	C
Benzeneethanol	8	X	P
ETHYLPHENYL ACETATE	11,12	X	C
B-PHENYLETHYL FORMATE	11,42	X	X
B-PHENYLETHYL ACETATE	11,44	X	X
1-phenyl-(2,2,2-2H3)ethanone	14,91	X	P
Hexadecane	14,98	X	X
REPLICA #5			
COMPUESTO	TIEMPO	C2CONUV	R5BA
Ethanol	1,48	X	
ACETIC ACID	1,69	X	C
1-Pentanol, 2-methyl-	3,4	X	C
Benzaldehyde	4,8	X	C
Benzeneacetaldehyde	6,4	X	C
Benzeneethanol	7,915	X	P
ETHYLPHENYL ACETATE	11,11	X	C
B-PHENYLETHYL FORMATE	11,42	X	C
B-PHENYLETHYL ACETATE	11,426	X	X
1-phenyl-(2,2,2-2H3)ethanone	14,91	X	P
Hexadecane	14,98	X	X
REPLICA #6			
COMPUESTO	TIEMPO	C2CONUV	R6BA
ETHANOL	1,52	X	C
Acetic acid	1,68	X	C
1-Pentanol, 2-methyl-	3,4	X	C
Benzaldehyde	4,8	X	C

Benzeneacetaldehyde	6,34	X	X
Benzeneethanol	7,89	X	P
ETHYLPHENYL ACETATE	11,11	X	C
B-PHENYLETHYL FORMATE	11,42	X	C
B-PHENYLETHYL ACETATE	11,426	X	X
1-phenyl-(2,2,2-2H3)ethanone	14,91	X	P
Hexadecane	14,98	X	X

ANEXO F

DIA 0 DE FERMENTACIÓN

Lactobacillus nagelii (CONDICIONES AEROBIAS)

Ethanol

RESUMEN

<i>Grupos</i>	<i>Cuenta</i>	<i>Suma</i>	<i>Promedio</i>	<i>Varianza</i>
620755	2	1241944	620972	128608722
114494	2	269379	134689,5	1536519613

ANÁLISIS DE VARIANZA

<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Valor crítico para F</i>
Entre grupos	2,3647E+11	1	2,3647E+11	284,02696	0,00350231	18,5128205
Dentro de los grupos	1665128335	2	832564167			
Total	2,3814E+11	3				

Benzaldehyde

RESUMEN

<i>Grupos</i>	<i>Cuenta</i>	<i>Suma</i>	<i>Promedio</i>	<i>Varianza</i>
370491	2	666527	333263,5	480779041
71986	2	165322	82661	3593145992

ANÁLISIS DE VARIANZA

<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Valor crítico para F</i>
Entre grupos	6,2802E+10	1	6,2802E+10	30,8310106	0,03093757	18,5128205
Dentro de los grupos	4073925033	2	2036962516			
Total	6,6876E+10	3				

1-[2-(2-Methylbutyl)phenyl]ethanone

RESUMEN

<i>Grupos</i>	<i>Cuenta</i>	<i>Suma</i>	<i>Promedio</i>	<i>Varianza</i>
330014	2	817548	408774	1633175552
47069	2	236801	118400,5	5348365313

ANÁLISIS DE VARIANZA

<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Valor crítico para F</i>
Entre grupos	8,4317E+10	1	8,4317E+10	24,1542007	0,03899508	18,5128205
Dentro de los grupos	6981540865	2	3490770432			

Total	9,1298E+10	3
-------	------------	---

2,3-Butanediol

RESUMEN

Grupos	Cuenta	Suma	Promedio	Varianza
57290	2	370160	185080	2281501250
499196	2	948609	474304,5	82012,5

ANÁLISIS DE VARIANZA

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	83650811400	1	83650811400	73,3269855	0,013364763	18,51282051
Dentro de los grupos	2281583263	2	1140791631			
Total	85932394663	3				

Benzeneethanol

RESUMEN

Grupos	Cuenta	Suma	Promedio	Varianza
216575	2	635086	317543	2,8707E+10
1581925	2	2992690	1496345	8450000000

ANÁLISIS DE VARIANZA

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F

Entre grupos	1,38957E+12	1	1,38957E+12	74,7938696	0,01310778	18,51282051
Dentro de los grupos	37157434498	2	18578717249			
Total	1,42673E+12	3				

***Lactobacillus nagelii* (CONDICIONES ANAEROBIAS)**

Benzeneethanol

RESUMEN

<i>Grupos</i>	<i>Cuenta</i>	<i>Suma</i>	<i>Promedio</i>	<i>Varianza</i>
216575	2	635086	317543	2,8707E+10
898320	2	1759585	879792,5	242726545

ANÁLISIS DE VARIANZA

<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Valor crítico para F</i>
Entre grupos	3,1612E+11	1	3,1612E+11	21,8392222	0,04286644	18,5128205
Dentro de los grupos	2,895E+10	2	1,4475E+10			
Total	3,4507E+11	3				

(3R)-3-Phenyl-2,3-dihydro-1H-isoindol

RESUMEN

<i>Grupos</i>	<i>Cuenta</i>	<i>Suma</i>	<i>Promedio</i>	<i>Varianza</i>
57290	2	106440	53220	245000
61656	2	521946	260973	2728831688

ANÁLISIS DE VARIANZA

<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Valor crítico para F</i>
Entre grupos	4,3161E+10	1	4,3161E+10	31,6307044	0,03019046	18,5128205
Dentro de los grupos	2729076688	2	1364538344			
Total	4,589E+10	3				

9-propylphenanthrene

RESUMEN

<i>Grupos</i>	<i>Cuenta</i>	<i>Suma</i>	<i>Promedio</i>	<i>Varianza</i>
34599	2	70280	35140	605000
428229	2	1006288	503144	81894402

ANÁLISIS DE VARIANZA

<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Valor crítico para F</i>
Entre grupos	2,1903E+11	1	2,1903E+11	5309,80198	0,00018828	18,5128205
Dentro de los grupos	82499402	2	41249701			
Total	2,1911E+11	3				

Acetophenone

RESUMEN

<i>Grupos</i>	<i>Cuenta</i>	<i>Suma</i>	<i>Promedio</i>	<i>Varianza</i>
261002	2	772742	386371	0
345557	2	1251940	625970	7701646050

ANÁLISIS DE VARIANZA

<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Valor crítico para F</i>
Entre grupos	5,7408E+10	1	5,7408E+10	14,907899	0,06100474	18,5128205
Dentro de los grupos	7701646050	2	3850823025			
Total	6,5109E+10	3				

Ethanol

RESUMEN

<i>Grupos</i>	<i>Cuenta</i>	<i>Suma</i>	<i>Promedio</i>	<i>Varianza</i>
620755	2	1241944	620972	128608722
104949	2	90564	45282	357513800

ANÁLISIS DE VARIANZA

<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Valor crítico para F</i>
Entre grupos	3,3142E+11	1	3,3142E+11	1363,52035	0,00073259	18,5128205
Dentro de los grupos	486122522	2	243061261			
Total	3,3191E+11	3				

Benzaldehyde

RESUMEN

<i>Grupos</i>	<i>Cuenta</i>	<i>Suma</i>	<i>Promedio</i>	<i>Varianza</i>
370491	2	666527	333263,5	480779041
21656	2	90647	45323,5	2513617705

ANÁLISIS DE VARIANZA

<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Valor crítico para F</i>
Entre grupos	8,2909E+10	1	8,2909E+10	55,3763917	0,01758336	18,5128205
Dentro de los grupos	2994396745	2	1497198373			
Total	8,5904E+10	3				

Saccharomyces cerevisiae (CONDICIONES AEROBIAS)

benzyl 2,2'-di-O-methyldivaricate

RESUMEN

<i>Grupos</i>	<i>Cuenta</i>	<i>Suma</i>	<i>Promedio</i>	<i>Varianza</i>
67290	2	106440	53220	245000
161397	2	292833	146416,5	201021301

ANÁLISIS DE VARIANZA

<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Valor crítico para F</i>
Entre grupos	8685587612	1	8685587612	86,3094079	0,01138867	18,5128205
Dentro de los grupos	201266301	2	100633150			
Total	8886853913	3				

Benzeneethanol

RESUMEN

<i>Grupos</i>	<i>Cuenta</i>	<i>Suma</i>	<i>Promedio</i>	<i>Varianza</i>
216575	2	336621	168310,5	4658923921
824012	2	1782400	891200	6164940800

ANÁLISIS DE VARIANZA

<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Valor crítico para F</i>
Entre grupos	5,2257E+11	1	5,2257E+11	96,558714	0,01019824	18,5128205
Dentro de los grupos	1,0824E+10	2	5411932360			
Total	5,3339E+11	3				

Sacch

aromy

ces

cerevi

siae

(COND

ICIONES ANAEROBIAS)

Benzaldehyde

RESUMEN

<i>Grupos</i>	<i>Cuenta</i>	<i>Suma</i>	<i>Promedio</i>	<i>Varianza</i>
370491	2	666527	333263,5	480779041
59756	2	56388	28194	315808712

ANÁLISIS DE VARIANZA

<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Valor crítico para F</i>
Entre grupos	9,3067E+10	1	9,3067E+10	233,665154	0,00425235	18,5128205
Dentro de los grupos	796587753	2	398293876			
Total	9,3864E+10	3				

Acetobacter pasteurianus (CONDICIONES AEROBIAS)

Acetic acid

<i>Grupos</i>	<i>Cuenta</i>	<i>Suma</i>	<i>Promedio</i>	<i>Varianza</i>
77158	2	205354	102677	1048352
2771571	2	3255909	1627954,5	7,0404E+10

ANÁLISIS DE VARIANZA

<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Valor crítico para F</i>
Entre grupos	2,3265E+12	1	2,3265E+12	66,0885241	0,01479623	18,5128205
Dentro de los grupos	7,0405E+10	2	3,5202E+10			
Total	2,3969E+12	3				

Benzeneethanol

RESUMEN

<i>Grupos</i>	<i>Cuenta</i>	<i>Suma</i>	<i>Promedio</i>	<i>Varianza</i>
216575	2	336621	168310,5	4658923921
1840351	2	4762527	2381263,5	4,0515E+11

ANÁLISIS DE VARIANZA

<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Valor crítico para F</i>
Entre grupos	4,8972E+12	1	4,8972E+12	23,89992	0,03938578	18,5128205
Dentro de los grupos	4,0981E+11	2	2,049E+11			
Total	5,307E+12	3				

Acetaldehyde

RESUMEN

<i>Grupos</i>	<i>Cuenta</i>	<i>Suma</i>	<i>Promedio</i>	<i>Varianza</i>
60755	2	1256244	628122	1168281122
235181	2	342631	171315,5	1810274621

ANÁLISIS DE VARIANZA

<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Valor crítico para F</i>
Entre grupos	2,0867E+11	1	2,0867E+11	140,116349	0,00706142	18,5128205
Dentro de los grupos	2978555743	2	1489277871			
Total	2,1165E+11	3				

Butanal, 3-methyl-

RESUMEN

<i>Grupos</i>	<i>Cuenta</i>	<i>Suma</i>	<i>Promedio</i>	<i>Varianza</i>
477568	2	1595350	797675	2,3493E+10
1457261	2	425510	212755	4424018048

ANÁLISIS DE VARIANZA

<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Valor crítico para F</i>
Entre grupos	3,4213E+11	1	3,4213E+11	24,5107015	0,03846021	18,5128205
Dentro de los grupos	2,7917E+10	2	1,3958E+10			
Total	3,7005E+11	3				

Benzaldehyde

RESUMEN

<i>Grupos</i>	<i>Cuenta</i>	<i>Suma</i>	<i>Promedio</i>	<i>Varianza</i>
370491	2	666527	333263,5	480779041
98767	2	97918	48959	1638323282

ANÁLISIS DE VARIANZA

<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Valor crítico para F</i>
Entre grupos	8,0829E+10	1	8,0829E+10	76,2861216	0,0128563	18,5128205
Dentro de los	2119102323	2	1059551161			

grupos

Total	8,2948E+10	3
-------	------------	---

***Acetobacter pasteurianus* (CONDICIONES ANAEROBIAS)**

Benzaldehyde

RESUMEN

<i>Grupos</i>	<i>Cuenta</i>	<i>Suma</i>	<i>Promedio</i>	<i>Varianza</i>
370491	2	666527	333263,5	480779041
20303	2	39492	19746	620498

ANÁLISIS DE VARIANZA

<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Valor crítico para F</i>
Entre grupos	9,8293E+10	1	9,8293E+10	408,364425	0,00243983	18,5128205
Dentro de los grupos	481399539	2	240699769			
Total	9,8775E+10	3				

DIA 1 DE FERMENTACIÓN

Lactobacillus nagelii (CONDICIONES ANEROBIAS)

Benzeneethanol

RESUMEN

<i>Grupos</i>	<i>Cuenta</i>	<i>Suma</i>	<i>Promedio</i>	<i>Varianza</i>
2548705	2	4419574	2209787	2,1403E+10
4921302	2	8992050	4496025	3,9924E+11

ANÁLISIS DE VARIANZA

<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Valor crítico para F</i>
Entre grupos	5,2269E+12	1	5,2269E+12	24,8517005	0,03796215	18,5128205
Dentro de los grupos	4,2065E+11	2	2,1032E+11			
Total	5,6475E+12	3				

***Saccharomyces cerevisiae* (CONDICIONES AEROBIAS)**

2,3-Butanediol					
Grupos	Cuenta	Suma	Promedio	Varianza	
206995	2	1060942	530471	3,5088E+10	
203787	2	1185773	592886,5	3,9821E+10	

ANÁLISIS DE VARIANZA

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	3895694640	1	3895694640	0,10401127	0,77766073	18,5128205
Dentro de los grupos	7,4909E+10	2	3,7455E+10			
Total	7,8805E+10	3				

2-Propyldecan-1-ol					
Grupos	Cuenta	Suma	Promedio	Varianza	
86334	2	39244	19622	191609888	
100510	2	151279	75639,5	122132821	

ANÁLISIS DE VARIANZA

Origen de las	Suma de cuadrados	Grados de	Promedio de los	F	Probabilidad	Valor crítico para F
---------------	-------------------	-----------	-----------------	---	--------------	----------------------

<i>variaciones</i>		<i>libertad</i>	<i>cuadrados</i>			
Entre grupos	3137960306	1	3137960306	20,0033991	0,04653005	18,5128205
Dentro de los grupos	313742709	2	156871354			
Total	3451703015	3				

Saccharomyces cerevisiae

iae (CONDICIONES ANAEROBIAS)

Acetobacter pasteurianus (CONDICIONES AEROBIAS)

Acetaldehyde

RESUMEN

<i>Grupos</i>	<i>Cuenta</i>	<i>Suma</i>	<i>Promedio</i>	<i>Varianza</i>
60755	2	1256244	628122	1168281122
41866	2	388477	194238,5	8821771621

ANÁLISIS DE VARIANZA

<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Valor crítico para F</i>
Entre grupos	1,8825E+11	1	1,8825E+11	37,688468	0,02552192	18,5128205
Dentro de los grupos	9990052743	2	4995026371			
Total	1,9824E+11	3				

Acetophenone

RESUMEN

<i>Grupos</i>	<i>Cuenta</i>	<i>Suma</i>	<i>Promedio</i>	<i>Varianza</i>
26050	2	278626	139313	95662112
37922	2	71526	35763	71856072

ANÁLISIS DE VARIANZA

<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Valor crítico para F</i>
Entre grupos	1,0723E+10	1	1,0723E+10	128,017177	0,0077211	18,5128205
Dentro de los grupos	167518184	2	83759092			
Total	1,089E+10	3				

Acetobacter pasteurianus (CONDICIONES ANAEROBIAS)

Benzaldehyde (

RESUMEN

<i>Grupos</i>	<i>Cuenta</i>	<i>Suma</i>	<i>Promedio</i>	<i>Varianza</i>
370491	2	666527	333263,5	480779041
35982	2	89799	44899,5	563103241

ANÁLISIS DE VARIANZA

<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Valor crítico para F</i>
Entre grupos	8,3154E+10	1	8,3154E+10	159,316425	0,00621833	18,5128205
Dentro de los grupos	1043882281	2	521941141			
Total	8,4198E+10	3				

Butyraldehyde**RESUMEN**

<i>Grupos</i>	<i>Cuenta</i>	<i>Suma</i>	<i>Promedio</i>	<i>Varianza</i>
129414	2	391091	195545,5	699118225
106053	2	196317	98158,5	226440481

ANÁLISIS DE VARIANZA

<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Valor crítico para F</i>
Entre grupos	9484227769	1	9484227769	20,4940599	0,04549089	18,5128205
Dentro de los grupos	925558705	2	462779353			
Total	1,041E+10	3				

DIA 2 DE FERMENTACIÓN***Candida metapsilosis (CONDICIONES AEROBIAS)*****Benzaldehyde (CAS)****RESUMEN**

<i>Grupos</i>	<i>Cuenta</i>	<i>Suma</i>	<i>Promedio</i>	<i>Varianza</i>
Control	2	440022	220011	1426420872
Inoculo	3	102984	34328	1197098688

ANÁLISIS DE VARIANZA

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	4,1374E+10	1	4,1374E+10	32,4872644	0,01070911	10,1279645
Dentro de los grupos	3820618248	3	1273539416			
Total	4,5194E+10	4				

Butanoic acid (CAS)

RESUMEN

Grupos	Cuenta	Suma	Promedio	Varianza
Control	2	200284	100142	21806408
Inoculo	3	32286	10762	347461932

ANÁLISIS DE VARIANZA

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	9586541280	1	9586541280	40,1261464	0,00795566	10,1279645
Dentro de los grupos	716730272	3	238910091			
Total	1,0303E+10	4				

Candida metapsilosis (CONDICIONES ANAEROBIAS)

2-Butanone, 3-hydroxy-

RESUMEN

Grupos	Cuenta	Suma	Promedio	Varianza
--------	--------	------	----------	----------

Control	2	369912	184956	3969048608
Inoculo	3	280420	93473,3333	468200656

ANÁLISIS DE VARIANZA

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	1,0043E+10	1	1,0043E+10	6,14187941	0,08940587	10,1279645
Dentro de los grupos	4905449921	3	1635149974			
Total	1,4948E+10	4				

Butanal, 3-methyl- (CAS)

RESUMEN

Grupos	Cuenta	Suma	Promedio	Varianza
Control	2	222813	111406,5	235596925
Inoculo	3	43563	14521	632578323

ANÁLISIS DE VARIANZA

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	1,1264E+10	1	1,1264E+10	22,5170082	0,01775368	10,1279645
Dentro de los grupos	1500753571	3	500251190			
Total	1,2765E+10	4				

Bacillus amyloliquefaciens (CONDICIONES AEROBIAS)

Benzaldehyde (CAS)

RESUMEN

Grupos	Cuenta	Suma	Promedio	Varianza
Control	2	440022	220011	1426420872
Inoculo	3	234058	78019,3333	64666070,3

ANÁLISIS DE VARIANZA

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	2,4194E+10	1	2,4194E+10	46,6538581	0,006421	10,1279645
Dentro de los grupos	1555753013	3	518584338			
Total	2,575E+10	4				

Bacillus amyloliquefaciens (CONDICIONES ANAEROBIAS)

Benzaldehyde (CAS)

Grupos	Cuenta	Suma	Promedio	Varianza
Control	2	440022	220011	1426420872
Inoculo	3	202381	67460,3333	345995244

ANÁLISIS DE VARIANZA

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	2,7926E+10	1	2,7926E+10	39,5476265	0,00812091	10,1279645
Dentro de los grupos	2118411361	3	706137120			
Total	3,0044E+10	4				

PHENYL ACETALDEHYDE**RESUMEN**

<i>Grupos</i>	<i>Cuenta</i>	<i>Suma</i>	<i>Promedio</i>	<i>Varianza</i>
<i>Control</i>	2	0	0	0
<i>Inoculo</i>	3	310609	103536,333	160368994

ANÁLISIS DE VARIANZA

<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Valor crítico para F</i>
<i>Entre grupos</i>	1,2864E+10	1	1,2864E+10	120,319955	0,00162226	10,1279645
<i>Dentro de los grupos</i>	320737989	3	106912663			
<i>Total</i>	1,3184E+10	4				

Saccharomyce cerevisaes (CONDICIONES AEROBIAS)**Benzaldehyde (CAS)**

<i>Grupos</i>	<i>Cuenta</i>	<i>Suma</i>	<i>Promedio</i>	<i>Varianza</i>
<i>Control</i>	2	440022	220011	1426420872
<i>Inoculo</i>	3	227020	75673,3333	2772664952

ANÁLISIS DE VARIANZA

<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Valor crítico para F</i>
<i>Entre grupos</i>	2,5E+10	1	2,5E+10	10,7577143	0,0464295	10,1279645

<i>Dentro de los grupos</i>	6971750777	3	2323916926
<i>Total</i>	3,1972E+10	4	

***Acetobacter syzygii* (CONDICIONES AEROBIAS)**

Benzaldehyde (CAS)

RESUMEN

<i>Grupos</i>	<i>Cuenta</i>	<i>Suma</i>	<i>Promedio</i>	<i>Varianza</i>
<i>Control</i>	2	440022	220011	1426420872
<i>Inoculo</i>	3	310927	103642,333	648129697

ANÁLISIS DE VARIANZA

<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Valor crítico para F</i>
<i>Entre grupos</i>	1,625E+10	1	1,625E+10	17,9051504	0,02414988	10,1279645
<i>Dentro de los grupos</i>	2722680267	3	907560089			
<i>Total</i>	1,8973E+10	4				

***Acetobacter syzygii* (CONDICIONES ANAEROBIAS)**

Benzaldehyde (CAS)

RESUMEN

<i>Grupos</i>	<i>Cuenta</i>	<i>Suma</i>	<i>Promedio</i>	<i>Varianza</i>
<i>Control</i>	2	440022	220011	1426420872
<i>Inoculo</i>	3	183251	61083,6667	173084494

ANÁLISIS DE VARIANZA

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	3,0309E+10	1	3,0309E+10	51,2969369	0,00560615	10,1279645
Dentro de los grupos	1772589861	3	590863287			
Total	3,2082E+10	4				

***Lactobacillus fermentum* (CONDICIONES ANAEROBIAS)**

Butanal, 3-methyl- (CAS)

RESUMEN

Grupos	Cuenta	Suma	Promedio	Varianza
Control	2	222813	111406,5	235596925
Inoculo	3	176060	58686,6667	83420924,3

ANÁLISIS DE VARIANZA

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	3335256992	1	3335256992	24,8628404	0,01550891	10,1279645
Dentro de los grupos	402438773	3	134146258			
Total	3737695765	4				

Acetaldehyde (CAS)

RESUMEN

Grupos	Cuenta	Suma	Promedio	Varianza
--------	--------	------	----------	----------

Control	2	440022	220011	1426420872
Inoculo	3	190375	63458,3333	1739490058

ANÁLISIS DE VARIANZA

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	2,941E+10	1	2,941E+10	17,9865938	0,02400492	10,1279645
Dentro de los grupos	4905400989	3	1635133663			
Total	3,4316E+10	4				

DIA 3 DE FERMENTACIÓN

Acetobacter ghanensis (CONDICIONES AEROBIAS)

Benzeneethanol (CAS)

Grupos	Cuenta	Suma	Promedio	Varianza
Control	3	5715578	1905192,667	5,87748E+11
Inoculo	3	1677133	559044,3333	36796938000

ANÁLISIS DE VARIANZA

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	2,71817E+12	1	2,71817E+12	8,704487452	0,041955306	7,708647421
Dentro de los grupos	1,24909E+12	4	3,12273E+11			

Total	3,96726E+12	5
-------	-------------	---

Decanoic acid, ethyl ester (CAS)

RESUMEN

Grupos	Cuenta	Suma	Promedio	Varianza
Control	3	0	0	0
Inoculo	3	269372	89790,66667	2401103436

ANÁLISIS DE VARIANZA

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	12093545731	1	12093545731	10,07332341	0,033733173	7,708647421
Dentro de los grupos	4802206873	4	1200551718			
Total	16895752603	5				

Acetic acid, ethyl ester (CAS)

Grupos	Cuenta	Suma	Promedio	Varianza
Control	3	4404653	1468217,667	72598569910
Inoculo	3	316285	105428,3333	33345400408

ANÁLISIS DE VARIANZA

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	2,78579E+12	1	2,78579E+12	52,58991413	0,001919571	7,708647421
Dentro de los grupos	2,11888E+11	4	52971985159			
Total	2,99768E+12	5				

***Acetobacter ghanensis* (CONDICIONES ANAEROBIAS)**

Acetic acid, ethyl ester (CAS)

RESUMEN

<i>Grupos</i>	<i>Cuenta</i>	<i>Suma</i>	<i>Promedio</i>	<i>Varianza</i>
Control	3	4404653	1468217,667	72598569910
Inoculo	3	161202	53734	8662028268

ANÁLISIS DE VARIANZA

<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Valor crítico para F</i>
Entre grupos	3,00115E+12	1	3,00115E+12	73,86472982	0,001007076	7,708647421
Dentro de los grupos	1,62521E+11	4	40630299089			
Total	3,16367E+12	5				

1-Butanol, 3-methyl- (impure)

RESUMEN

<i>Grupos</i>	<i>Cuenta</i>	<i>Suma</i>	<i>Promedio</i>	<i>Varianza</i>
Control	3	2317992	772664	33036833827
Inoculo	3	364610	121536,6667	11241827233

ANÁLISIS DE VARIANZA

<i>Origen de las</i>	<i>Suma de</i>	<i>Grados de</i>	<i>Promedio de los</i>	<i>F</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Valor crítico</i>
----------------------	----------------	------------------	------------------------	----------	---------------------	----------------------

<i>variaciones</i>	<i>cuadrados</i>	<i>libertad</i>	<i>cuadrados</i>	<i>para F</i>		
Entre grupos	6,3595E+11	1	6,3595E+11	28,72490681	0,005848035	7,708647421
Dentro de los grupos	88557322121	4	22139330530			
Total	7,24508E+11	5				

Benzeneethanol (CAS)

RESUMEN

<i>Grupos</i>	<i>Cuenta</i>	<i>Suma</i>	<i>Promedio</i>	<i>Varianza</i>
Control	3	5715578	1905192,667	5,87748E+11
Inoculo	3	298014	99338	399189819

ANÁLISIS DE VARIANZA

<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Valor crítico para F</i>
Entre grupos	4,89167E+12	1	4,89167E+12	16,63415002	0,015117045	7,708647421
Dentro de los grupos	1,17629E+12	4	2,94074E+11			
Total	6,06796E+12	5				

Lactobacillus fermentum (CONDICIONES AEROBIAS)

1-Butanol, 3-methyl- (impure) (CAS)

RESUMEN

<i>Grupos</i>	<i>Cuenta</i>	<i>Suma</i>	<i>Promedio</i>	<i>Varianza</i>
Control	3	2317992	772664	33036833827
Inoculo	3	467753	155917,6667	19753934090

ANÁLISIS DE VARIANZA

<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Valor crítico para F</i>
Entre grupos	5,70564E+11	1	5,70564E+11	21,61605455	0,009666463	7,708647421
Dentro de los grupos	1,05582E+11	4	26395383959			
Total	6,76146E+11	5				

Decanoic acid, ethyl ester (CAS)

RESUMEN

<i>Grupos</i>	<i>Cuenta</i>	<i>Suma</i>	<i>Promedio</i>	<i>Varianza</i>
Control	3	0	0	0
Inoculo	3	738167	246055,6667	18019547632

ANÁLISIS DE VARIANZA

<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Valor crítico para F</i>
Entre grupos	90815086648	1	90815086648	10,07961892	0,03370116	7,708647421
Dentro de los grupos	36039095265	4	9009773816			
Total	1,26854E+11	5				

***Lactobacillus fermentum* (CONDICIONES ANAEROBIAS)**

Ethanol, 2-nitro- (CAS)

<i>Grupos</i>	<i>Cuenta</i>	<i>Suma</i>	<i>Promedio</i>	<i>Varianza</i>
Control	3	2023379	674459,6667	1,48813E+11
Inoculo	3	486490	162163,3333	20526035657

ANÁLISIS DE VARIANZA

<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Valor crítico para F</i>
Entre grupos	3,93671E+11	1	3,93671E+11	4,649509548	0,097294776	7,708647421
Dentro de los grupos	3,38678E+11	4	84669424951			
Total	7,32349E+11	5				

Acetic acid, ethyl ester (CAS)

<i>Grupos</i>	<i>Cuenta</i>	<i>Suma</i>	<i>Promedio</i>	<i>Varianza</i>
Control	3	4919172	1639724	89133495507
Inoculo	3	342553	114184,3333	39114185936

ANÁLISIS DE VARIANZA

<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Valor crítico para F</i>
Entre grupos	3,49091E+12	1	3,49091E+12	54,44007833	0,00179853	7,708647421
Dentro de los grupos	2,56495E+11	4	64123840722			
Total	3,7474E+12	5				

1-Butanol, 3-methyl- (impure) (CAS)

RESUMEN

Grupos	Cuenta	Suma	Promedio	Varianza
Control	3	2317992	772664	33036833827
Inoculo	3	1022915	340971,6667	35179141512

ANÁLISIS DE VARIANZA

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	2,79537E+11	1	2,79537E+11	8,195658117	0,045799617	7,708647421
Dentro de los grupos	1,36432E+11	4	34107987670			
Total	4,15969E+11	5				

Decanoic acid, ethyl ester (CAS)

RESUMEN

Grupos	Cuenta	Suma	Promedio	Varianza
Control	3	0	0	0
Inoculo	3	770610	256870	1940328517

ANÁLISIS DE VARIANZA

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F

Entre grupos	98973295350	1	98973295350	102,0170497	0,000540686	7,708647421
Dentro de los grupos	3880657034	4	970164258,5			
Total	1,02854E+11	5				

***Lactobacillus nagelii* (CONDICIONES AEROBIAS)**

Acetic acid, ethyl ester (CAS)

RESUMEN

<i>Grupos</i>	<i>Cuenta</i>	<i>Suma</i>	<i>Promedio</i>	<i>Varianza</i>
Control	3	4919172	1639724	89133495507
Inoculo	3	496616	165538,6667	82209150485

ANÁLISIS DE VARIANZA

<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Valor crítico para F</i>
Entre grupos	3,25983E+12	1	3,25983E+12	38,05046405	0,003506942	7,708647421
Dentro de los grupos	3,42685E+11	4	85671322996			
Total	3,60252E+12	5				

***Saccharomyce cerevisaes* (CONDICIONES AEROBIAS)**

Acetic acid, ethyl ester (CAS)

<i>Grupos</i>	<i>Cuenta</i>	<i>Suma</i>	<i>Promedio</i>	<i>Varianza</i>
---------------	---------------	-------------	-----------------	-----------------

Control	3	4919172	1639724	89133495507
Inoculo	3	721742	240580,6667	64238709856

ANÁLISIS DE VARIANZA

<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Valor crítico para F</i>
Entre grupos	2,9364E+12	1	2,9364E+12	38,29120268	0,003466453	7,708647421
Dentro de los grupos	3,06744E+11	4	76686102682			
Total	3,24315E+12	5				

1-Butanol, 3-methyl- (impure) (CAS)

RESUMEN

<i>Grupos</i>	<i>Cuenta</i>	<i>Suma</i>	<i>Promedio</i>	<i>Varianza</i>
Control	3	2317992	772664	33036833827
Inoculo	3	1134327	378109	21280751563

ANÁLISIS DE VARIANZA

<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Valor crítico para F</i>
Entre grupos	2,3351E+11	1	2,3351E+11	8,597969529	0,042718704	7,708647421
Dentro de los grupos	1,08635E+11	4	27158792695			
Total	3,42146E+11	5				

Saccharomyce cerevisaes (CONDICIONES ANAEROBIAS)

1-Butanol, 3-methyl- (impure) (CAS)

Grupos	Cuenta	Suma	Promedio	Varianza
Control	3	2317992	772664	33036833827
Inoculo	3	998806	332935,3333	5981020366

ANÁLISIS DE VARIANZA

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	2,90042E+11	1	2,90042E+11	14,86714	0,018212412	7,708647421
Dentro de los grupos	78035708387	4	19508927097			
Total	3,68078E+11	5				

Acetic acid, ethyl ester (CAS)

Grupos	Cuenta	Suma	Promedio	Varianza
Control	3	4919172	1639724	89133495507
Inoculo	3	712323	237441	71331931021

ANÁLISIS DE VARIANZA

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	2,9496E+12	1	2,9496E+12	36,76301471	0,003736017	7,708647421
Dentro de los grupos	3,20931E+11	4	80232713264			
Total	3,27053E+12	5				

Benzeneethanol (CAS)

<i>Grupos</i>	<i>Cuenta</i>	<i>Suma</i>	<i>Promedio</i>	<i>Varianza</i>
Control	3	5715578	1905192,667	5,87748E+11
Inoculo	3	898156	299385,3333	2,20019E+11

ANÁLISIS DE VARIANZA

<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Valor crítico para F</i>
Entre grupos	3,86793E+12	1	3,86793E+12	9,576826638	0,036409764	7,708647421
Dentro de los grupos	1,61554E+12	4	4,03884E+11			
Total	5,48346E+12	5				

DIA 4 DE FERMENTACIÓN

Bacillus subtilis (CONDICIONES AEROBIAS)

Acetic acid				
<i>Grupos</i>	<i>Cuenta</i>	<i>Suma</i>	<i>Promedio</i>	<i>Varianza</i>
463691	2	2724454	1362227	8764615202
1390328	2	4095356	2047678	1,3939E+10

ANÁLISIS DE VARIANZA

<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Valor crítico para F</i>
----------------------------------	--------------------------	---------------------------	----------------------------------	----------	---------------------	-----------------------------

Entre grupos	4,6984E+11	1	4,6984E+11	41,3889885	0,02331922	18,5128205
Dentro de los grupos	2,2704E+10	2	1,1352E+10			
Total	4,9255E+11	3				

Benzeneacetaldehyde

Grupos	Cuenta	Suma	Promedio	Varianza
11404	2	30535	15267,5	23950120,5
73111	2	196969	98484,5	52213980,5

ANÁLISIS DE VARIANZA

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	6925069089	1	6925069089	181,846014	0,00545421	18,5128205
Dentro de los grupos	76164101	2	38082050,5			
Total	7001233190	3				

Phenylvinylacetylene

RESUMEN

Grupos	Cuenta	Suma	Promedio	Varianza
115561	2	772665	386332,5	2483362813
4394736	2	8773942	4386971	9,7218E+11

ANÁLISIS DE VARIANZA

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	1,6005E+13	1	1,6005E+13	32,8421947	0,02912496	18,5128205

Dentro de los			
grupos	9,7467E+11	2	4,8733E+11
Total	1,698E+13	3	

Benzeneacetic acid, 2-phenylethyl

RESUMEN

<i>Grupos</i>	<i>Cuenta</i>	<i>Suma</i>	<i>Promedio</i>	<i>Varianza</i>
976238	2	1806131	903065,5	276477613
442886	2	339735	169867,5	5695966645

ANÁLISIS DE VARIANZA

<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Valor crítico para F</i>
Entre grupos	5,3758E+11	1	5,3758E+11	180,019866	0,00550908	18,5128205
Dentro de los grupos	5972444257	2	2986222129			
Total	5,4355E+11	3				

***Bacillus subtilis* (CONDICIONES ANAEROBIAS)**

3-Penten-2-ol

RESUMEN

<i>Grupos</i>	<i>Cuenta</i>	<i>Suma</i>	<i>Promedio</i>	<i>Varianza</i>
---------------	---------------	-------------	-----------------	-----------------

101022	2	191875	95937,5	1034078765
68523	2	456875	228437,5	546580985

ANÁLISIS DE VARIANZA

<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Valor crítico para F</i>
Entre grupos	1,7556E+10	1	1,7556E+10	22,2138256	0,04218866	18,5128205
Dentro de los grupos	1580659749	2	790329875			
Total	1,9137E+10	3				

Caffeine

RESUMEN

<i>Grupos</i>	<i>Cuenta</i>	<i>Suma</i>	<i>Promedio</i>	<i>Varianza</i>
15771	2	32290	16145	1235592
96215	2	145725	72862,5	139528513

ANÁLISIS DE VARIANZA

<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Valor crítico para F</i>
Entre grupos	3216874806	1	3216874806	45,7058967	0,0211862	18,5128205
Dentro de los grupos	140764105	2	70382052,3			
Total	3357638911	3				

Candida metapsilosis (CONDICIONES AEROBIAS)

B-PHENYLETHYL FORMATE

RESUMEN

<i>Grupos</i>	<i>Cuenta</i>	<i>Suma</i>	<i>Promedio</i>	<i>Varianza</i>
136641	2	1838347	919173,5	37853700,5
114725	2	245610	122805	295633928

ANÁLISIS DE VARIANZA

<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Valor crítico para F</i>
Entre grupos	6,34203E+11	1	6,34203E+11	3803,456162	0,00026282	18,5128205
Dentro de los grupos	333487628,5	2	166743814,3			
Total	6,34536E+11	3				

Hexadecane

RESUMEN

<i>Grupos</i>	<i>Cuenta</i>	<i>Suma</i>	<i>Promedio</i>	<i>Varianza</i>
17789	2	842714	421357	336493682
72243	2	68341	34170,5	23756724,5

ANÁLISIS DE VARIANZA

<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Valor crítico para F</i>
Entre grupos	1,49913E+11	1	1,49913E+11	832,2732359	0,00119937	18,5128205
Dentro de los grupos	360250406,5	2	180125203,3			
Total	1,50274E+11	3				

Candida metapsilosis (CONDICIONES ANAEROBIAS)

ETHYLPHENYL ACETATE

RESUMEN

<i>Grupos</i>	<i>Cuenta</i>	<i>Suma</i>	<i>Promedio</i>	<i>Varianza</i>
136641	2	381741	190870,5	382812,5
11685	2	67344	33672	300174002

ANÁLISIS DE VARIANZA

<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Valor crítico para F</i>
Entre grupos	2,4711E+10	1	2,4711E+10	164,437253	0,00602643	18,5128205
Dentro de los grupos	300556815	2	150278407			
Total	2,5012E+10	3				

B-PHENYLETHYL FORMATE

RESUMEN

<i>Grupos</i>	<i>Cuenta</i>	<i>Suma</i>	<i>Promedio</i>	<i>Varianza</i>
976238	2	1838347	919173,5	37853700,5
18090	2	29169	14584,5	18428520,5

ANÁLISIS DE VARIANZA

<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Valor crítico para F</i>
Entre grupos	8,1828E+11	1	8,1828E+11	29077,7885	3,4389E-05	18,5128205

Dentro de los grupos	56282221	2	28141110,5
Total	8,1834E+11	3	

***Acetobacter ghanensis* (CONDICIONES AEROBIAS)**

BENZENEACETALDEHYDE

RESUMEN

<i>Grupos</i>	<i>Cuenta</i>	<i>Suma</i>	<i>Promedio</i>	<i>Varianza</i>
418758	2	669678	334839	4735396562
16041	2	55696	27848	169169618

ANÁLISIS DE VARIANZA

<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Valor crítico para F</i>
Entre grupos	9,4243E+10	1	9,4243E+10	38,4309114	0,02504723	18,5128205
Dentro de los grupos	4904566180	2	2452283090			
Total	9,9148E+10	3				

Pentadecane

RESUMEN

<i>Grupos</i>	<i>Cuenta</i>	<i>Suma</i>	<i>Promedio</i>	<i>Varianza</i>
136641	2	439940	219970	1643020488

163375	2	139651	69825,5	88591360,5
--------	---	--------	---------	------------

ANÁLISIS DE VARIANZA

<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Valor crítico para F</i>
Entre grupos	2,2543E+10	1	2,2543E+10	26,0374412	0,0363264	18,5128205
Dentro de los grupos	1731611849	2	865805924			
Total	2,4275E+10	3				

ACETIC ACID

RESUMEN

<i>Grupos</i>	<i>Cuenta</i>	<i>Suma</i>	<i>Promedio</i>	<i>Varianza</i>
463691	2	2724454	1362227	8764615202
551026	2	285215	142607,5	2,9061E+10

ANÁLISIS DE VARIANZA

<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Valor crítico para F</i>
Entre grupos	1,4875E+12	1	1,4875E+12	78,6479323	0,01247742	18,5128205
Dentro de los grupos	3,7826E+10	2	1,8913E+10			
Total	1,5253E+12	3				

Acetobacter ghanensis (CONDICIONES ANAEROBIAS)

Benzeneethanol

RESUMEN

<i>Grupos</i>	<i>Cuenta</i>	<i>Suma</i>	<i>Promedio</i>	<i>Varianza</i>
1335499	2	2844061	1422030,5	6,9908E+10
4497434	2	1429552	714776	8,0267E+11

ANÁLISIS DE VARIANZA

<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Valor crítico para F</i>
Entre grupos	5,0021E+11	1	5,0021E+11	1,14650216	0,39636638	18,5128205
Dentro de los grupos	8,7258E+11	2	4,3629E+11			
Total	1,3728E+12	3				

Acetic acid, 2-phenylethyl ester (CAS)

RESUMEN

<i>Grupos</i>	<i>Cuenta</i>	<i>Suma</i>	<i>Promedio</i>	<i>Varianza</i>
976238	2	1838347	919173,5	37853700,5
221194	2	516497	258248,5	1,4149E+10

ANÁLISIS DE VARIANZA

<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Valor crítico para F</i>
Entre grupos	4,3682E+11	1	4,3682E+11	61,5790947	0,01585412	18,5128205
Dentro de los grupos	1,4187E+10	2	7093671283			
Total	4,5101E+11	3				

***Acetobacter pasteurianus* (CONDICIONES AEROBIAS)**

2-Naphthalene-sulfonic acid

RESUMEN

<i>Grupos</i>	<i>Cuenta</i>	<i>Suma</i>	<i>Promedio</i>	<i>Varianza</i>
36960	2	82918	41459	8511938
270586	2	448716	224358	404871968

ANÁLISIS DE VARIANZA

<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Valor crítico para F</i>
Entre grupos	3,3452E+10	1	3,3452E+10	161,844928	0,00612207	18,5128205
Dentro de los grupos	413383906	2	206691953			
Total	3,3865E+10	3				

1-phenyl-(2,2,2-2H3)ethanone

RESUMEN

<i>Grupos</i>	<i>Cuenta</i>	<i>Suma</i>	<i>Promedio</i>	<i>Varianza</i>
17789	2	184214	92107	2728448
84280	2	152068	76034	0

ANÁLISIS DE VARIANZA

<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Valor crítico para F</i>
Entre grupos	258341329	1	258341329	189,368703	0,00523924	18,5128205
Dentro de los grupos	2728448	2	1364224			
Total	261069777	3				

Benzeneacetaldehyde

RESUMEN

<i>Grupos</i>	<i>Cuenta</i>	<i>Suma</i>	<i>Promedio</i>	<i>Varianza</i>
418758	2	669678	334839	4735396562
36634	2	89284	44642	3511250

ANÁLISIS DE VARIANZA

<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Valor crítico para F</i>
Entre grupos	8,4214E+10	1	8,4214E+10	35,5416489	0,02700163	18,5128205
Dentro de los grupos	4738907812	2	2369453906			
Total	8,8953E+10	3				

***Acetobacter pasteurianus* (CONDICIONES ANAEROBIAS)**

BENZENEACETALDEHYDE

RESUMEN

<i>Grupos</i>	<i>Cuenta</i>	<i>Suma</i>	<i>Promedio</i>	<i>Varianza</i>
418758	2	669678	334839	4735396562
151993	2	162825	81412,5	1268719565

ANÁLISIS DE VARIANZA

<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Valor crítico para F</i>
Entre grupos	6,4225E+10	1	6,4225E+10	21,3936538	0,04370155	18,5128205
Dentro de los grupos	6004116127	2	3002058063			
Total	7,0229E+10	3				

(Z)-But-2-enyl benzoate

RESUMEN

<i>Grupos</i>	<i>Cuenta</i>	<i>Suma</i>	<i>Promedio</i>	<i>Varianza</i>
976238	2	1838347	919173,5	37853700,5
23078	2	232746	116373	9623283912

ANÁLISIS DE VARIANZA

<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Valor crítico para F</i>
Entre grupos	6,4449E+11	1	6,4449E+11	133,41879	0,00741197	18,5128205

Dentro de los grupos	9661137613	2	4830568806
Total	6,5415E+11	3	

***Bacillus amyloliquefaciens* (CONDICIONES AEROBIAS)**

Ethanol

RESUMEN

<i>Grupos</i>	<i>Cuenta</i>	<i>Suma</i>	<i>Promedio</i>	<i>Varianza</i>
3035588	2	3711041	1855520,5	1,2345E+11
103756	2	212074	106037	16808402

ANÁLISIS DE VARIANZA

<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Valor crítico para F</i>
Entre grupos	3,0607E+12	1	3,0607E+12	49,5774656	0,01958	18,5128205
Dentro de los grupos	1,2347E+11	2	6,1736E+10			
Total	3,1842E+12	3				

benzophenone

RESUMEN

<i>Grupos</i>	<i>Cuenta</i>	<i>Suma</i>	<i>Promedio</i>	<i>Varianza</i>
---------------	---------------	-------------	-----------------	-----------------

331791	2	806768	403384	349536800
28257	2	122857	61428,5	457985113

ANÁLISIS DE VARIANZA

<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Valor crítico para F</i>
Entre grupos	1,1693E+11	1	1,1693E+11	289,610875	0,00343513	18,5128205
Dentro de los grupos	807521913	2	403760956			
Total	1,1774E+11	3				

ETHYLPHENYL ACETATE

RESUMEN

<i>Grupos</i>	<i>Cuenta</i>	<i>Suma</i>	<i>Promedio</i>	<i>Varianza</i>
136641	2	381741	190870,5	382812,5
57620	2	117022	58511	964571042

ANÁLISIS DE VARIANZA

<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Valor crítico para F</i>
Entre grupos	1,7519E+10	1	1,7519E+10	36,3106218	0,02645228	18,5128205
Dentro de los grupos	964953855	2	482476927			
Total	1,8484E+10	3				

Bacillus amyloliquefaciens (CONDICIONES ANAEROBIAS)

Ethanol

<i>Grupos</i>	<i>Cuenta</i>	<i>Suma</i>	<i>Promedio</i>	<i>Varianza</i>
3035588	2	3711041	1855520,5	1,2345E+11
58163	2	45584	22792	16176672

ANÁLISIS DE VARIANZA

<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Valor crítico para F</i>
Entre grupos	3,3589E+12	1	3,3589E+12	54,4080435	0,01788796	18,5128205
Dentro de los grupos	1,2347E+11	2	6,1735E+10			
Total	3,4824E+12	3				

