

UNIVERSIDAD DE OVIEDO

**MASTER UNIVERSITARIO EN BIOTECNOLOGÍA
ALIMENTARIA**

**“POSIBILIDADES DE VALORIZACIÓN
DE CASCARILLA DE CACAO
MEDIANTE PROCESOS DE
FERMENTACIÓN”**

**TRABAJO FIN DE MASTER
POR
CARMEN SANJUÁN DUARTE**

JULIO, 2024



AGRADECIMIENTOS

A mis tutoras, Adriana Laca y Amanda Laca, por su paciencia, comprensión y dedicación.

A Bess, por su ayuda en todo el proceso y su paciencia para acompañarme y explicarme todo.

A mis compañeros de clase, por el apoyo incondicional en el camino.

A mi familia y amigos por estar siempre.

Gracias.

ÍNDICE

RESUMEN	5
ABSTRACT	6
ÍNDICE FIGURAS	7
ÍNDICE TABLAS	9
ÍNDICE ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS.....	10
1. INTRODUCCIÓN	11
2. FUNDAMENTOS TEÓRICOS	14
2.1 Industria agroalimentaria	14
2.2 Sector del cacao	14
2.3 Cascarilla del grano de cacao.....	17
2.3.1 Composición nutricional.....	18
2.3.2 Alternativas de valorización	20
2.4 El vinagre.....	21
3 MATERIAL Y MÉTODOS	23
3.1 Material de partida: cascarilla de cacao	23
3.2 Hidrólisis ácido-hidrotérmica de la cascarilla de cacao.....	23
3.3 Preparación medios de cultivo.....	23
3.4 Procesos de fermentación.....	23
3.4.1 Fermentación alcohólica.....	24
3.4.2 Fermentación acética	25
3.5 Análisis	26
3.5.1 Medida de pH	26
3.5.2 Cuantificación carbohidratos totales	27
4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	32
4.1 Fermentación alcohólica	32
4.1.1 Crecimiento de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	32

4.1.2	Consumo de azúcares totales y reductores.....	33
4.1.3	Evolución pH	35
4.1.4	Producción de etanol.....	36
4.2	Fermentación acética.....	37
4.2.1	Crecimiento de <i>Acetobacter aceti</i>	37
4.2.2	Consumo azúcares totales y reductores.....	39
4.2.3	Evolución pH	40
4.2.4	Producción de ácido acético.....	41
5	CONCLUSIONES	43
	BIBLIOGRAFÍA	44

RESUMEN

En la actualidad, la industria agroalimentaria produce una cantidad significativa de residuos orgánicos como resultado de sus procesos de producción y transformación, lo cual conlleva importantes problemas ambientales, sociales y económicos. En concreto, los residuos alimentarios de origen vegetal son los que más se desperdician en la cadena alimentaria. Debido a su composición, estos residuos son de gran interés como sustrato para ser empleados en procesos de valorización.

El presente trabajo aborda la posibilidad de emplear cascarilla de cacao, la principal biomasa generada en la industria chocolatera, como sustrato para la producción de vinagre mediante dos fermentaciones sucesivas, alcohólica y acética. La cascarilla de cacao fue tratada mediante una hidrólisis ácido-térmica y el hidrolizado obtenido fue fermentado consecutivamente con *Saccharomyces cerevisiae* y *Acetobacter aceti*. Los procesos de fermentación fueron analizados mediante la determinación del pH, carbohidratos totales, azúcares reductores, etanol y ácido acético, así como el recuento de microorganismos en placa.

A pesar de haberse observado un consumo de carbohidratos totales de aproximadamente 22 g/L durante la fermentación alcohólica, quedando al final un remanente de unos 600 mg/L de azúcares reductores, la concentración de etanol más alta obtenida fue tan solo de 1.97 g/L, lo que indica una eficacia de conversión de los azúcares en etanol inferior al 18%. Como consecuencia de una inadecuada fermentación alcohólica, únicamente fue posible alcanzar una concentración máxima de acético de 0.5 g/L. Estas bajas eficacias pueden ser debidas a errores experimentales, tales como la posible oxigenación del medio durante la fermentación alcohólica o el inadecuado crecimiento de la levadura, errores que deberán ser evitados en trabajos futuros.

ABSTRACT

Nowadays, the agro-food industry generates a notable amount of organic wastes coming from its production and transformation processes, which entails considerable environmental, social, and economic problems. Specifically, vegetal wastes have the highest percentage of wastage along the food chain. Due to their composition, these wastes are of great interest to be employed as substrate in valorisation processes.

This work addresses the possibility of using cocoa bean shell, the main biomass generated in the chocolate industry, as a substrate for the production of vinegar by means of two successive fermentations, alcoholic and acetic. The cocoa bean shell was treated by acid-thermal hydrolysis and the hydrolysate obtained was consecutively fermented with *Saccharomyces cerevisiae* and *Acetobacter aceti*. The fermentation processes were analysed by determining the pH, total carbohydrates, reducing sugars, ethanol, and acetic acid, as well as plate count of microorganisms.

Despite having observed a total carbohydrate consumption of approximately 22 g/L during alcoholic fermentation, achieving at the end of the process a remaining amount of about 600 mg/L of reducing sugars, the highest ethanol concentration obtained was only 1.97 g/L. This indicates a conversion efficiency of sugars into ethanol lower than 18%. As a consequence of an inadequate alcoholic fermentation, it was only possible to reach a maximum acetic acid concentration of 0.5 g/L. These low efficiencies may be due to experimental errors, such as possible oxygenation of the medium during alcoholic fermentation or insufficient yeast growth, which should be avoided in future work.

ÍNDICE FIGURAS

Figura 1. Volumen de la producción mundial de cacao (en millones de toneladas) Fuente: (International Cocoa Organization, 2024).....	13
Figura 2. Pasos de la producción y subproductos del cacao.....	16
Figura 3. Diferentes aplicaciones de la valorización a raíz de la cascarilla de cacao.....	20
Figura 4. Matraces en la incubadora a 30°C y movimiento constante de 135rpm	24
Figura 5. Centrifuga para eppendorf Centrifuge 5424	25
Figura 6. Incubador refrigerado con agitación orbital ECOLAN 70-R.....	26
Figura 7. pHmetro Basic 20+ (Crison).....	26
Figura 8. Espectrofotómetro Analytik Jena SPEKOL 1300/1500	27
Figura 9. Patrón calibrado glucosa	28
Figura 10. Recta calibrado carbohidratos totales.....	28
Figura 11. Patrones de glucosa para realizar la curva de calibrado de los carbohidratos reductores. De izquierda a derecha: 1000ppm, 800ppm, 600ppm, 400ppm, 200ppm, blanco.....	29
Figura 12. Recta patrón azúcares reductores, realizada con el programa Excel.....	30
Figura 13. Calibrado de etanol medido por HPLC con diferentes concentraciones.....	30
Figura 14. Recta calibrado ácido acético. Realizado en Excel	31
Figura 15. Crecimiento de la levadura <i>Saccharomyces cerevisiae</i> durante la fermentación alcohólica.....	33
Figura 16. Concentración de azúcares totales medidos en diferentes días durante la fermentación alcohólica.....	34
Figura 17. Cantidad de azúcares reductores medidos en mg/L en diferentes días durante la fermentación alcohólica.....	34
Figura 18. Gráfica medición de pH durante la etapa de fermentación alcohólica.....	35
Figura 19. Gráfica % concentración (v/v) de etanol medido por HPLC en la fermentación alcohólica.....	36
Figura 20. Crecimiento bacteria <i>Acetobacter aceti</i> durante la fermentación acética.....	38
Figura 21. Crecimiento bacterias ácido acéticas en fermentación óptima. Fuente: (Mounir et al.,2021)	38
Figura 22. Cantidad de azúcares totales medidos en mg/L en diferentes días durante la fermentación acética.....	39

Figura 23. Cantidad de azúcares reductores medidos en mg/L en diferentes días durante la fermentación acética39

Figura 24. Gráfica medición pH durante la etapa de fermentación acética.....40

Figura 25. Evolución parámetro pH y ácido total durante el proceso de elaboración del vinagre. Fuente: (Hou et al.,2023).....41

Figura 26. Gráfica concentración ácido acético en la fermentación acética.....42

ÍNDICE TABLAS

Tabla 1. Composición nutricional de la cascarilla de cacao. Valores medios obtenidos a partir de datos experimentales. Fuente: (Sánchez Suárez-Otero, 2023).....17

ÍNDICE ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS

Abreviaturas

UFC = Unidades Formadoras de Colonias

GEI = Gases de Efecto Invernadero

PNUMA = Programa de las Naciones Unidas para el Medio Ambiente

NaCl = Cloruro de Sodio

HPLC = Cromatografía Líquida de Alta Eficacia

RID: = Detector de Índice de Refracción

YPG = Extracto de Levadura, Peptona, Glucosa (medio de cultivo)

Rpm = Revoluciones por Minuto

H₂SO₄ = Ácido Sulfúrico

Símbolos

°C = Grados Celsius

μL = Microlitros

mg/L = Miligramos por Litro

ppm = Partes por Millón

% (v/v) = Porcentaje en Volumen

Nm = Nanómetros

1. INTRODUCCIÓN

De acuerdo al Banco Mundial, se estima que la generación anual de residuos se incrementa en 3.400 millones de toneladas en los próximos 30 años, con respecto a los 20.010 millones de toneladas generados en 2016 (Kaza et al., 2018). Según el informe del Programa de las Naciones Unidas para el Medio Ambiente (PNUMA), se espera que la generación de residuos sólidos urbanos aumente de 2.300 millones de toneladas en 2023 a 3.800 millones de toneladas en 2050 (United Nations Environment Programme, 2024).

En los países desarrollados, hasta el 93% de los residuos generados están constituidos por más de 50% de residuos biodegradables (Ferronato & Torretta, 2019). La gestión inadecuada de los residuos orgánicos tiene un importante impacto a nivel medio ambiental, por ello, resulta fundamental llevar a cabo un adecuado plan de gestión, control y tratamiento de dichos residuos. Aunque es cierto que la cantidad de residuos valorizados en la Unión Europea se ha incrementado significativamente en los últimos años, la reutilización y valorización de los residuos orgánicos sigue siendo una asignatura pendiente. Hasta un 60% de los residuos totales generados fueron procesados mediante operaciones de valorización en 2020, dentro de la Unión Europea. Pero, el 40% restante fue depositado en vertedero sin posibilidad de ser valorizados (Waste Statistics Statistics Explained, 2023).

Las posibles consecuencias de la crisis climática y los efectos ya observados están conduciendo a la implantación de acciones para reducir las emisiones antropogénicas de gases de efecto invernadero (GEI) (Röck et al., 2020). Entre ellas, fomentar el uso de materias primas renovables puede ayudar a mitigar el cambio climático (de Freitas et al., 2021). La biomasa lignocelulósica, es la materia prima renovable más abundante, con una producción global de aproximadamente 182.000 millones de toneladas, de las cuales sólo se aprovechan 8.000 millones de toneladas (Abo et al., 2019). Esta biomasa incluye plantas y residuos procedentes de su procesamiento, como los desechos agrícolas y de las fábricas de papel. Contiene tres de los polímeros naturales más abundantes del planeta: celulosa, lignina y hemicelulosa, que pueden emplearse, entre otras aplicaciones, para la fabricación de bioplásticos, con o sin funcionalización, o para la síntesis de compuestos químicos (Inyang et al., 2022).

En este contexto, resulta clave medir el grado de implantación de las estrategias para potenciar la economía circular y la sostenibilidad en la cadena agroalimentaria. Dentro de

los residuos agroalimentarios, se encuentran los generados por la industria del cacao: el cacao (*Theobroma cacao L.*) es uno de los cultivos más importantes a nivel mundial. La industria del cacao es un sector que está en auge, sobre todo en los mercados en expansión de Europa Occidental y América del Norte, debido a la gran popularidad y amplio uso de este producto en la industria alimentaria y de bebidas (Statista, 2024). Los granos de cacao son la materia prima para las grandes industrias alimentarias que elaboran chocolate y productos derivados como la pasta de cacao, manteca de cacao, polvo de cacao o licor de cacao, llegando a tener un crecimiento sin precedentes en la oferta mundial durante la última década (Tridge, 2021). Cerca de tres cuartas partes de la cosecha mundial de cacao proceden de países africanos, principalmente de la región de África occidental (Figura 1). En concreto, el cacao es el principal producto agrícola exportado en países como Ghana, Costa de Marfil y Ecuador (The Observatory of Economic Complexity (OEC), 2022).

Durante el proceso de obtención de los granos de cacao, se generan una serie de residuos, en concreto, la vaina, la pulpa y la cascarilla. Los dos primeros se producen en los países de origen donde se procesa el fruto del cacao, mientras que el último es el residuo mayoritario generado en las industrias chocolateras que emplean como materia prima el grano de cacao. Esta biomasa generada en las diferentes etapas de procesamiento del cacao es generalmente descartada, sin embargo, puede ser un interesante material para ser empleado en procesos de valorización (Vásquez et al., 2019).

En los últimos años, han aparecido diversos estudios sobre las alternativas de valorización de los residuos procedentes del sector del cacao. En concreto, la cascarilla de cacao puede ser empleada en diferentes aplicaciones, incluyendo su uso en los sectores alimentario, farmacéutico o energético (Belwal et al., 2022; Darmawan & Mutalib, 2024; Vásquez et al., 2019)



Figura 1. Volumen de la producción mundial de cacao (en millones de toneladas) Fuente: (International Cocoa Organization, 2024)

España es el séptimo importador de granos de cacao de Europa, obteniendo en su mayoría la materia prima directamente de los países productores, con unos volúmenes que han ido en aumento en los últimos años. Se sitúa en el cuarto puesto como mayor procesador de cacao de Europa (CBI Ministry of Foreign Affairs, 2021). La cascarilla constituye aproximadamente el 10% en peso de los granos de cacao y es generada como residuo durante su procesado industrial.

El vinagre es un líquido que contiene al menos un 4% de ácido acético y se usa directamente o como ingrediente en alimentos. Se produce típicamente mediante dos etapas de fermentación. Las frutas como manzanas (para hacer vinagre de sidra) y uvas (vinagre de vino) son comúnmente utilizadas como materia prima, al igual que otras fuentes vegetales como el arroz o la malta (vinagre de cereales), así como la caña de azúcar (Ministerio de Agricultura, 2013). De las múltiples opciones de valorización que presentan los residuos de cascarilla de cacao, el objetivo de este trabajo es estudiar la posibilidad de emplear este residuo como materia prima para la elaboración de un condimento similar al vinagre.

2. FUNDAMENTOS TEÓRICOS

2.1 Industria agroalimentaria

La industria agroalimentaria genera una cantidad significativa de residuos orgánicos, que presentan un desafío ambiental considerable debido a su volumen y composición. Según la Agencia Europea de Medio Ambiente, en Europa se producen aproximadamente 88 millones de toneladas de residuos alimentarios anualmente, de los cuales un porcentaje significativo proviene del sector agroalimentario (European Food Information Council (EUFIC), 2021). Estos residuos, si no se gestionan adecuadamente, pueden contribuir a la emisión de gases de efecto invernadero, como el metano, agravando el problema del cambio climático (Poore & Nemecek, 2018). No obstante, la implementación de prácticas de economía circular ofrece una solución prometedora para mitigar estos impactos, como la gestión de residuos para generar compost que se utiliza para enriquecer los suelos y reducir el volumen de residuos o reducir los GEI (Saha, 2023).

Además, existen potenciales alternativas de valorización, como la conversión de biomasa lignocelulósica en bioplásticos y otros materiales de alto valor añadido representa una oportunidad para incrementar la sostenibilidad del sector. (Blasi et al., 2023).

Como materia orgánica, la celulosa, la lignina y la hemicelulosa son los principales componentes de la biomasa lignocelulósica de origen vegetal. Debido a su abundancia, capacidad de renovación y compatibilidad biológica, son materiales extremadamente valiosos en diversas aplicaciones comerciales. Estas características sugieren que, con una gestión adecuada, se podría reducir la dependencia actual de la sociedad de los recursos fósiles. No obstante, los materiales lignocelulósicos tienen baja solubilidad y son difíciles de procesar, lo que limita su uso efectivo y práctico. Por lo tanto, frecuentemente se requieren tratamientos previos para facilitar su conversión en fuentes de energía o recursos renovables utilizables (Mankar et al., 2021; Verardi et al., 2018).

2.2 Sector del cacao

El cacao es un cultivo de gran importancia económica, ambiental, social y cultural a nivel mundial, pero especialmente en los principales países productores: Costa de Marfil, Ghana, Indonesia, Nigeria, Camerún, Ecuador y Brasil, países que representan hasta un 90% de la producción global (Arvelo et al., 2017). Aproximadamente 45 millones de

personas en todo el mundo obtienen ingresos de la producción de cacao, de los cuales el 70% son pequeñas explotaciones (Voorra et al., 2019). La producción anual mundial alcanza los 5 millones de toneladas de granos de cacao. Hay 4 principales variedades de cacao: Criollo, Trinitario, Nacional y Forastero, esta última es la más representativa para las explotaciones agrícolas comerciales con un 80% de la producción mundial (Mariatti et al., 2021). Por todo ello, la industria de cacao tiene importantes implicaciones en relación a diversos temas relevantes, tales como la gestión eficiente de recursos naturales, la preservación de ecosistemas locales y biodiversidad, la capacidad de resiliencia ante el cambio climático y la gestión y aprovechamiento de los residuos generados.

El fruto del cacao se compone por la vaina del fruto, es la parte protectora y ancha que envuelve los granos de cacao que se encuentran en el interior, luego está la pulpa, que es la parte comestible que cubre los granos, también conocido como mucílago, y después se encuentran los granos de cacao en el interior representando entre un 21% y un 23% del fruto. La cascarilla que envuelve al grano constituye el 2,1% y 2,3% del peso total del fruto del cacao (Campos-Vega et al., 2018; De La et al., 2011).

La producción de cascarilla de cacao es importante, representa entre el 12% y el 16% del grano del cacao (Rojo-Poveda et al., 2020; Vásquez et al., 2019).

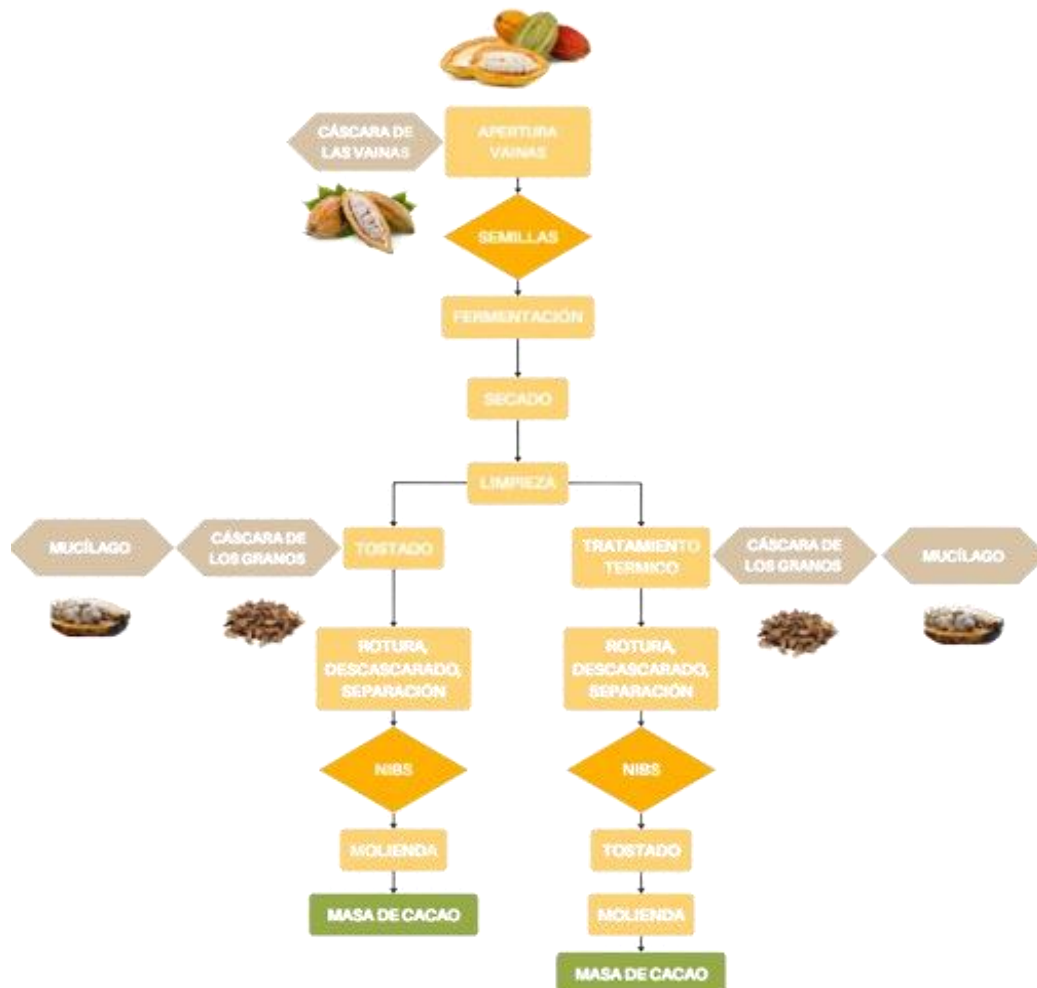


Figura 2. Pasos de la producción y subproductos del cacao.

De acuerdo a este dato, se calcula aproximadamente alrededor de 700.000 toneladas de producción de cascarilla de cacao (International Cocoa Organization, 2016).

La figura 2 muestra las etapas de procesamiento del cacao y los subproductos/residuos obtenidos. El proceso comienza con la apertura de las mazorcas de cacao, la vaina, parte más externa del fruto, representa el 75% de la fruta entera (Lu et al., 2018). Se extraen las semillas, son fermentadas, etapa durante la cual se genera como residuo el mucílago y, posteriormente, se secan. Después del secado se obtienen los granos de cacao que se emplean en la industria chocolatera.

2.3 Cascarilla del grano de cacao

La cascara de la vaina o mazorca del cacao, la cascarilla del grano de cacao (CGC) y el mucílago generan aproximadamente alrededor de 20 toneladas por tonelada de grano de cacao secos (Acosta et al., 2018).

La cascarilla se trata de la cubierta externa que envuelve el grano del cacao, es un producto que normalmente se deshecha como residuo durante el tostado del cacao. La cascarilla del grano de cacao contiene proteínas, carbohidratos, fibra dietética (rica en lignina y polisacáridos no amiláceos: celulosa, hemicelulosa y pectina), compuestos fenólicos, metilxantinas, como cafeína y teobromina, fitoesteroles y grasas. El resumen de su composición se muestra en la Tabla 1.

Tabla 1. Composición nutricional de la cascarilla de cacao. Valores medios obtenidos a partir de datos experimentales. Fuente: (Sánchez Suárez-Otero, 2023).

Compuesto	g/100g materia seca
Cenizas	5,2
Proteína	12,6
Lípidos	5,1
Carbohidratos	30
Lignina insoluble	24,9
Humedad	5,1

Sin embargo, la composición de la CGC puede cambiar, ya que, al ser de origen vegetal, está influenciada por diversos factores como el clima de la región de cultivo, la variedad del cacao y otras condiciones de procesamiento durante la fermentación, secado o temperatura de tostado. (Diomande et al., 2015). También se ha observado que el contenido de grasa es significativamente inferior que, en los granos de cacao, y, por el contrario, presenta un mayor porcentaje de fibra dietética. (Quispe-Sanchez et al., 2023).

En todo el mundo se producen más de 700.000 toneladas de residuos de CGC, de las cuales más de 250.000 toneladas provienen de la producción europea. Por cada kg de chocolate se genera alrededor de 98 g de CGC (Afrane & Ntiamoah, 2011). La gestión de

la cascarilla de cacao podría acarrear problemas económicos y ambientales (Rebollo-Hernanz et al., 2019; Rojo-Poveda et al., 2019).

Debido a su alta concentración de fibra y compuestos antioxidantes, la cáscara del cacao ha despertado un interés creciente en procesos de valorización. Esta puede ser utilizada como materia prima para obtener compuestos de alto valor añadido, con posibles aplicaciones en las industrias alimentaria, farmacéutica y cosmética (Balentic et al., 2018a) Recientemente, se ha estado investigando las alternativas para encontrar nuevos usos para este subproducto. Existen diferentes opciones de valorización en áreas agronómicas, como piensos para animales, también para la producción de energía o materia prima para la extracción de biomoléculas, entre otras muchas aplicaciones.

2.3.1 Composición nutricional

Los carbohidratos (CHO), también conocidos como hidratos de carbono, glúcidos o azúcares, son biomoléculas compuestas mayormente por átomos de carbono, hidrógeno y oxígeno. Las funciones principales de los glúcidos incluyen proporcionar energía de forma inmediata como glucosa o almacenarla para consumo posterior como almidón o glucógeno, así como una función estructural, siendo parte de la pared celular de los vegetales. Los carbohidratos pueden clasificarse según la estructura y complejidad de sus moléculas. Los monosacáridos, la unidad elemental más simple, están formados por una sola molécula. Los disacáridos, como la sacarosa, lactosa y maltosa, están compuestos por dos unidades de monosacáridos. Los oligosacáridos se componen de entre tres y diez monosacáridos, mientras que los polisacáridos consisten en cadenas, ramificadas o no, de más de diez monosacáridos. Dentro de los polisacáridos, se distinguen homopolisacáridos, formados por el mismo tipo de monosacárido (ejemplos: almidón, glucógeno y celulosa), y heteropolisacáridos, compuestos por diferentes tipos de monosacáridos (ejemplos: hemicelulosas y pectinas)(Food and Agriculture Organization of the United Nations, 1996).

En los granos de cacao, los carbohidratos constituyen uno de los principales macronutrientes, influyendo en el sabor durante los procesos de fermentación y tostado. Los granos más tostados contienen más carbohidratos que los no tostados, reflejándose en la transferencia de azúcares hacia la capa exterior observada en la cáscara del grano (Agus et al., 2018). El contenido de carbohidratos en la cáscara de cacao varía entre 504

y 606 g/kg de peso seco, con variaciones significativas debido al cálculo del contenido de fibra (Martínez et al., 2012). Estos carbohidratos están compuestos principalmente por polisacáridos: pectina (45%), celulosa (35%) y hemicelulosa (20%), que en conjunto constituyen fibra dietética (Redgwell et al., 2003).

Los carbohidratos predominan en la composición química de la cascarilla del grano de cacao, estando entre un 65% y un 80% aproximadamente, de los cuales alrededor del 50% se trata de fibra dietética. (Younes et al., 2023).

Según el Codex Alimentarius, las fibras dietéticas (FD) son polímeros de carbohidratos con más de diez unidades monoméricas que no pueden ser digeridos por las enzimas endógenas del intestino delgado humano. Dependiendo de su función en el intestino y su solubilidad en agua, las FD se clasifican en solubles (FDS) e insolubles (FDI). Las fibras solubles en agua, como las pectinas, gomas y ciertas hemicelulosas, forman geles viscosos al hidratarse, tienen alta fermentabilidad y generan gran cantidad de ácidos grasos volátiles (AGV), contribuyendo a aumentar el volumen fecal y la masa bacteriana. Estas fibras se encuentran en frutas, legumbres, vegetales y extractos de plantas. Por otro lado, la celulosa, lignina y algunas hemicelulosas son parte de las FDI, fibras poco fermentables que, aunque producen menores cantidades de AGV, también mejoran la osmolaridad y aceleran el tránsito intestinal (FAO/WHO Food Standards Programme, 2010).

La composición de FD en la cascarilla de cacao es rica en polisacáridos pépticos, celulósicos y, en menor medida, hemicelulósicos. Esta característica es atractiva para la extracción y generación de oligosacáridos no digeribles provenientes de la cascarilla (Redgwell et al., 2003).

Entre los compuestos bioactivos beneficiosos presentes en la cascarilla de cacao se encuentran numerosos fitoquímicos, principalmente polifenoles, como flavan-3-oles, epicatequina y catequina, y compuestos fenólicos como quercetina, ácido gálico, ácido protocatecuico y cafeico (Ramos-Escudero et al., 2023).

El cacao y sus subproductos también son conocidos por su riqueza en metilxantinas, como teobromina y cafeína (Okuyama et al., 2017). Todas las cantidades de compuestos varían en función de la zona geográfica y el tipo de procesado como hemos mencionado

anteriormente. La cafeína, por ejemplo, se encuentra en cantidades más elevadas entre los tipos fermentados y secos, y significativamente menor después del tostado.

2.3.2 Alternativas de valorización

En los últimos años se han explorado diferentes alternativas de valorización de la cascarilla del grano de cacao (CGC), con el fin de descubrir nuevas aplicaciones para este subproducto. Entre las alternativas investigadas se encuentran la formulación de nuevos alimentos, la producción de biocombustibles, la extracción de compuestos bioactivos y su uso como adsorbente en procesos industriales. La figura 3 se muestra una visión de las distintas aplicaciones potenciales de la CGC.



Figura 3. Diferentes aplicaciones de la valorización a raíz de la cascarilla de cacao.

Varios estudios informan sobre la investigación sobre los compuestos bioactivos, los cuales han tenido un gran interés por sus múltiples beneficios para la salud (Granado-Lorencio & Hernández-Alvarez, 2016; Gul et al., 2016; Sachdeva et al., 2020). Los compuestos bioactivos forman parte de la composición de la CGC y pueden tener efectos

beneficiosos en ciertas enfermedades, tales como diabetes, hipertensión o hipercolesterolemia (Balentic et al., 2018b).

Se ha observado también el potencial de los oligosacáridos y polisacáridos de la CGC, obtenidos mediante la acción de enzimas, con resultados beneficiosos como antioxidantes y prebióticos que pueden ser de utilidad en la mejora del tránsito intestinal y protección contra el daño celular (Younes & Karboune, 2023).

2.4 El vinagre

El vinagre ha sido un componente esencial en la dieta humana desde tiempos antiguos, utilizándose ampliamente como conservante, condimento, aromatizante e incluso como una bebida beneficiosa para la salud. Además, sus propiedades medicinales han sido reconocidas y aplicadas en la medicina tradicional durante siglos (Solieri & Giudici, 2009). El proceso de elaboración del vinagre puede partir de cualquier fuente de carbohidratos, ya sean sustratos amiláceos o azucarados, y se lleva a cabo mediante dos etapas de fermentación sucesivas.

Primero, se realiza la fermentación alcohólica, en la que las levaduras del género *Saccharomyces* transforman los azúcares presentes en la materia prima en etanol. Este proceso ocurre en condiciones anaerobias y es crucial para la conversión inicial de los carbohidratos en alcohol. Posteriormente, el etanol producido se somete a la fermentación acética, en la que las bacterias ácido acéticas, principalmente del género *Acetobacter* y *Gluconobacter*, oxidan el etanol para producir ácido acético en condiciones aerobias (Raspor & Goranovič, 2008; Song et al., 2019).

Estas dos fermentaciones permiten transformar una variedad de materias primas en vinagre, incluyendo frutas, cereales, y otras fuentes ricas en carbohidratos. Este enfoque versátil no solo ofrece una amplia gama de sabores y aplicaciones culinarias, sino que también garantiza la calidad y las características sensoriales del producto final. El vinagre, por tanto, no solo sigue siendo un ingrediente fundamental en la cocina y la salud humana, sino que también representa una tradición biotecnológica de gran importancia histórica y cultural.

Recientemente se ha investigado la producción y elaboración de vinagre a partir de materia prima procedente de los residuos de la industria frutícola utilizando diferentes partes de la fruta de cascaras de naranja, limón o fresa (Bruna-Maynou et al., 2020; Cejudo Bastante et al., 2010).

3 MATERIAL Y MÉTODOS

3.1 Material de partida: cascarilla de cacao

Para este trabajo se utilizó como materia prima cascarilla de cacao suministrada por la empresa Chocolates del Norte S.A., fábrica perteneciente al grupo LACASA, situada en Siero, Asturias.

3.2 Hidrólisis ácido-hidrotérmica de la cascarilla de cacao

Como paso previo a la fermentación y con el fin de obtener mayor cantidad de azúcares fermentables y compuestos bioactivos, la cascarilla de cacao se sometió a un proceso de hidrólisis. Las condiciones de hidrólisis fueron fijadas en función de los resultados obtenidos en trabajos previos.

Primeramente, se molió la cascarilla de cacao empleando un molinillo de café eléctrico y, en botellas de PYREX de 1 litro de capacidad, se mezclaron 120 g de cascarilla de cacao molida con 500 ml de agua destilada, ajustando entre 4,5 y 5 el pH (Basic 20+, Crison Instruments) con ácido cítrico 1 M. Posteriormente, se introdujeron las botellas en un autoclave (AES 75, Raypa) durante 10 minutos a una temperatura de 135°C. Tras el tratamiento hidrotérmico, se dejaron enfriar las botellas para posteriormente emplear el caldo obtenido como sustrato en la fermentación alcohólica.

3.3 Preparación medios de cultivo.

Se preparó medio de cultivo YPG (10 g extracto de levadura, 20 g peptona, 20 g glucosa y 20 g agar (en el caso de medio sólido) en un litro de agua destilada) (VWR). Este medio fue empleado para el crecimiento de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* 1327 que fue suministrada por la Colección Española de Cultivos (CECT)

Por otro lado, se preparó medio de cultivo Manitol (5 g extracto de levadura, 3 g peptona, 25 g manitol y 20 g agar (en el caso de medio sólido) en un litro de agua destilada) (VWR). Este medio fue utilizado para el crecimiento de la bacteria *Acetobacter aceti* 298T que fue suministrada por la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT).

3.4 Procesos de fermentación.

Se ha llevado a cabo dos fermentaciones consecutivas que fueron realizadas por duplicado.

3.4.1 Fermentación alcohólica

Para preparar el preinóculo, se inocularon 1-2 colonias de *S. cerevisiae* en un matraz de 250 ml con 50 ml de medio YPG y se incubó en un incubador durante 24 horas, a 30°C y 135 rpm (Figura 4).



Figura 4. Matraces en la incubadora a 30°C y movimiento constante de 135rpm

Se tomaron 2 ml del preinóculo una vez crecido, se centrifugaron, el pellet se resuspendió en una solución de NaCl al 0.7% y se inoculó en 900 ml del caldo hidrolizado. La fermentación se llevó a cabo durante 6 días a 30°C y 50 rpm (New brunswick G-25 incubator shaker).

Durante la fermentación, fueron tomándose muestras a diferentes tiempos a fin de seguir la evolución del proceso. Se tomaron muestras para la siembra en placa y se midió el pH. Paralelamente, las muestras fueron centrifugadas a 12.500 rpm durante 5 minutos (Centrifuge 5424) (Figura 5) y se congeló el sobrenadante para poder realizar el seguimiento de los carbohidratos totales y azúcares reductores.



Figura 5. Centrifuga para eppendorf Centrifuge 5424

3.4.2 Fermentación acética

Para preparar el preinóculo de *A. aceti* se inocularon 1-2 colonias de la bacteria en un matraz en un medio de cultivo Manitol e incubándolo durante 72 h a 30°C a 150 rpm.

Después se tomaron muestras de 600 μ L del preinóculo, se centrifugaron, el pellet se resuspendió en NaCl al 0.7% y se introdujeron en 300 mL de caldo hidrolizado procedente de la fermentación alcohólica. La etapa de fermentación acética se llevó a cabo durante 6 días a 30°C con 250rpm. (Figura 6). Durante la fermentación se fueron tomando diferentes muestras para la siembra de placa y se midió el pH. Paralelamente, las muestras fueron centrifugadas a 12.500 rpm durante 5 minutos (Centrifuge 5424) (Figura 5) y se congeló el sobrenadante para poder realizar el seguimiento de los carbohidratos totales y azúcares reductores.



Figura 6. Incubador refrigerado con agitación orbital ECOLAN 70-R

3.5 Análisis

Todos los análisis fueron llevados a cabo por triplicado.

3.5.1 Medida de pH

Para medir el pH se empleó un pH-metro Basic 20+ (Crison) (Figura 7)



Figura 7. pHmetro Basic 20+ (Crison)

3.5.2 Cuantificación carbohidratos totales

Para la cuantificación de los carbohidratos totales se utilizó el método espectrofotométrico de Dubois (fenol-ácido sulfúrico) (Dubois et al., 1956), empleando un espectrofotómetro Analytik Jena SPEKOL 1300/1500 (Figura 6). Las muestras se trataron con fenol y ácido sulfúrico de la siguiente manera:

1. Se añade 1 ml de muestra a un tubo de vidrio y a continuación se añaden 0,5 ml de fenol al 5% y 2,5 ml de H₂SO₄ al 96% y se agita. Para el blanco se añade 1 ml de agua destilada en vez de muestra.
2. Se deja reaccionar una hora aproximadamente hasta que la mezcla se enfría y se mide la absorbancia a 492 nm.

Para poder cuantificar los carbohidratos es necesario realizar una recta patrón utilizando glucosa en diferentes concentraciones (Figura 9). En la Figura 10 se muestra la recta de calibrado obtenida.



Figura 8. Espectrofotómetro Analytik Jena SPEKOL 1300/1500

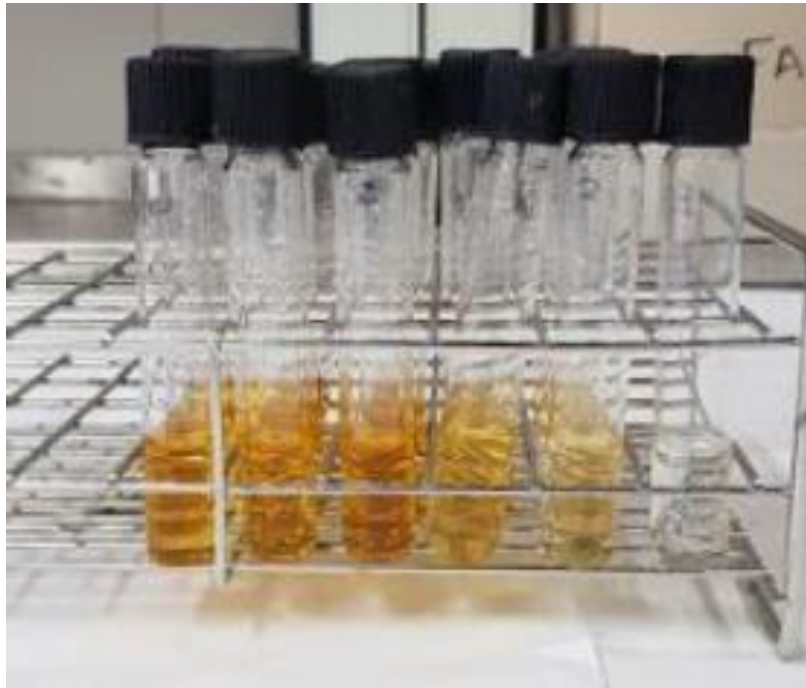


Figura 9. Patrón calibrado glucosa

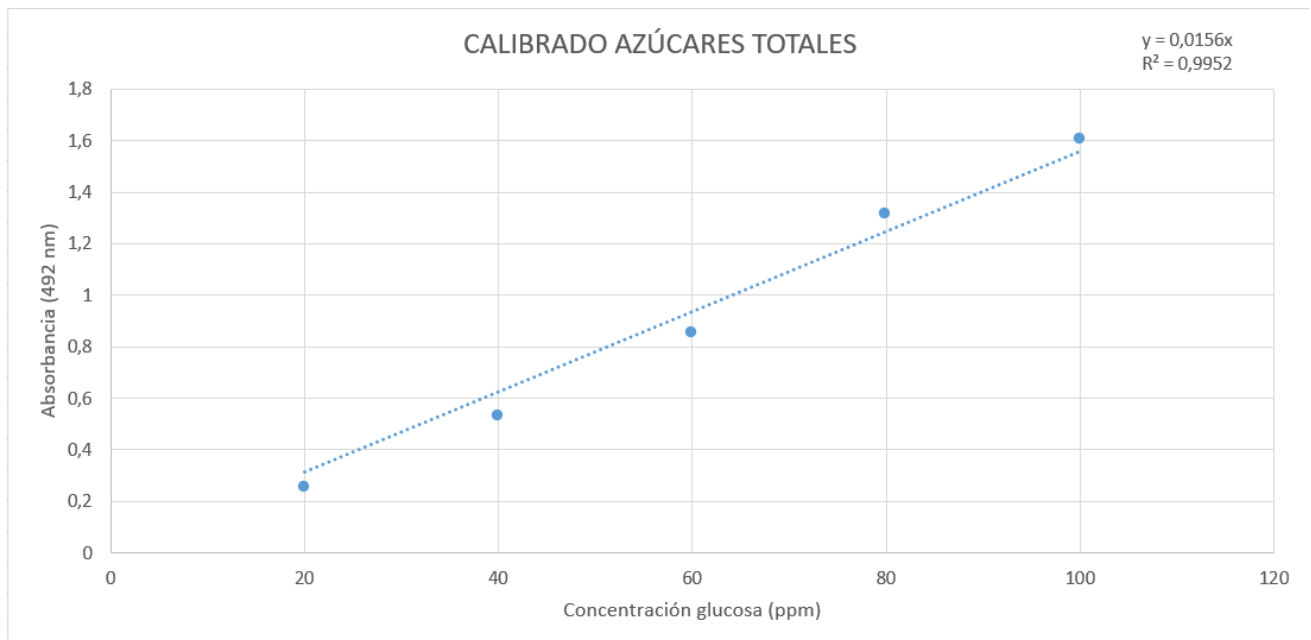


Figura 10. Recta calibrado carbohidratos totales.

3.5.3 Cuantificación azúcares reductores

Para la cuantificación de los azúcares reductores se aplicó el método del ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS) (Bello Gil et al., 2006). Para la preparación del DNS se mezclan 1,6 g NaOH con 30 g de tartrato de sodio y potasio tetrahidratado en aproximadamente 80 ml de agua hasta que se disuelven, a continuación, se añade despacio 1 g de DNS, se enrasa y se deja en agitación 12 horas hasta su total disolución. El proceso se llevó a cabo de la siguiente manera:

1. Se mezclan 0,5 ml de muestra con 0,5 ml de DNS. Para el blanco se añaden 0,5 ml de agua destilada en vez de muestra.
2. Se incuban en un baño a 95°C durante 5 minutos.
3. Se enfrían en hielo durante 5 minutos.
4. Se añade a cada tubo 5 ml de agua destilada y se mide la absorbancia a 540 nm.

Para poder cuantificar los azúcares reductores es necesario realizar una recta patrón utilizando glucosa en diferentes concentraciones (Figura 10), representando la absorbancia frente a la concentración de azúcar. En la Figura 11 se muestra la recta de calibrado obtenida.

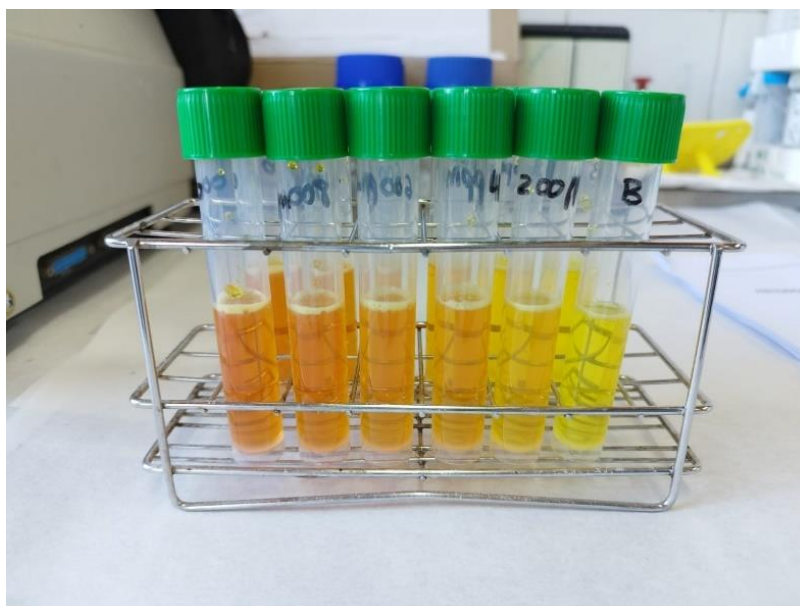


Figura 11. Patrones de glucosa para realizar la curva de calibrado de los carbohidratos reductores. De izquierda a derecha: 1000ppm, 800ppm, 600ppm, 400ppm, 200ppm, blanco.

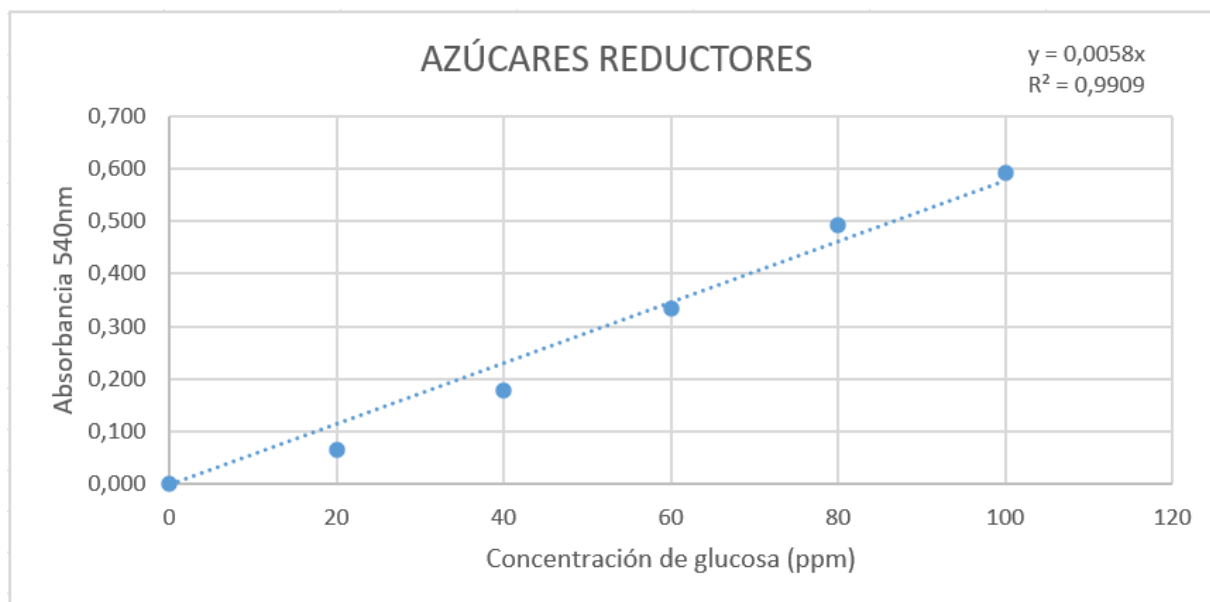


Figura 12. Recta patrón azúcares reductores, realizada con el programa Excel

3.5.4 Cuantificación de etanol y ácido acético

Para cuantificar la concentración de etanol y ácido acético se empleó cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC) (Agilent 1200 Series). Se utilizó la columna ICSep ICE-ION 300 (Teknokroma) con un detector de índice de refracción (RID), la fase móvil utilizada fue ácido sulfúrico (0.45 mM). En la Figura 13 se muestra el calibrado del etanol y en la Figura 14 el del ácido acético.

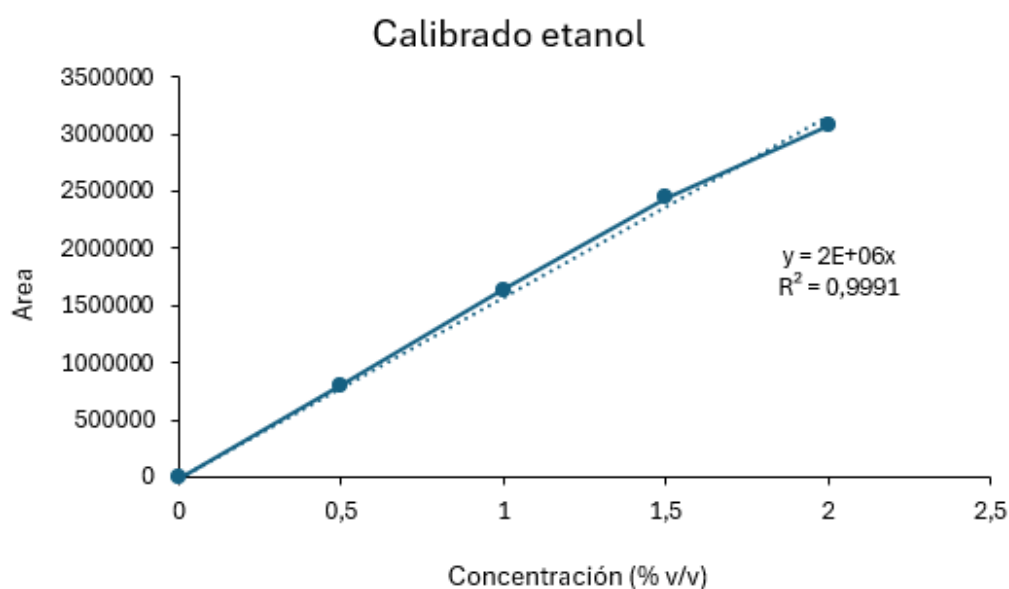


Figura 13. Calibrado de etanol medido por HPLC con diferentes concentraciones

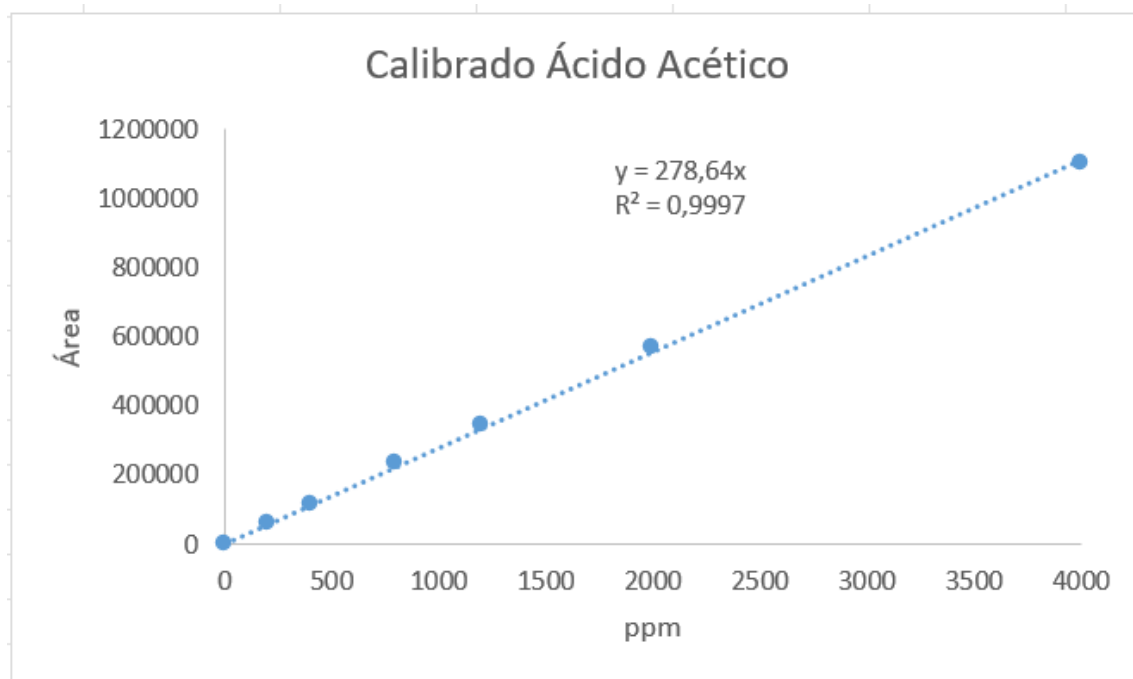


Figura 14. Recta calibrado ácido acético. Realizado en Excel

3.5.5 Crecimiento microorganismos

Para la cuantificación de UFC, se tomó 1 g de muestra, se mezcló con 9mL de NaCl 0'7% en un stomacher, posteriormente, se hicieron diluciones seriadas y se sembró en medio YPG o Manitol, según se siguiese el crecimiento de *S. cerevisia* o *A. aceti*, respectivamente. Las placas se incubaron a 30°C durante 24-48 h, para hacer el recuento de UFC.

4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Fermentación alcohólica

4.1.1 Crecimiento de *Saccharomyces cerevisiae*

El proceso de fermentación alcohólica es llevado a cabo por la levadura *S. cerevisiae*. En esta etapa los azúcares fermentables pasan a formar etanol, a través de la actividad metabólica de la levadura. En general, *S. cerevisiae* es un organismo acidófilo, y como tal, su rango de crecimiento óptimo se encuentra en un pH entre 4 y 6 (Narendranath & Power, 2005). Es necesario controlar las condiciones de pH, que se mantuvieron entre 4,5 y 5, en todo el proceso de fermentación. La temperatura se mantuvo constante a 30°C y la velocidad de agitación fue de 50 rpm. Con esta agitación tan baja se trató de asegurar que hubiera mezcla sin introducir oxígeno que alteraría el metabolismo de las levaduras reduciendo la producción de etanol.

En varios estudios sobre el crecimiento de *S. cerevisiae* se muestra que llega a alcanzar las 10^8 células/mL, en procesos de fermentación alcohólica (Ferreira et al., 2009; Hidalgo et al., 2012; Morrissey et al., 2004).

En el gráfico de la Figura 15, vemos el crecimiento de la levadura que alcanzó el estado estacionario aproximadamente a las 24 h. Es posible que varios factores hayan influido en su crecimiento como el consumo de azúcares inicial. La concentración inicial óptima para el aumento de crecimiento de la levadura esperado es de alrededor de 40 kg/m³ (Lin et al., 2014). Un consumo de azúcares inferior podría experimentar una velocidad de crecimiento reducida y alcanzar el estado estacionario temprano.

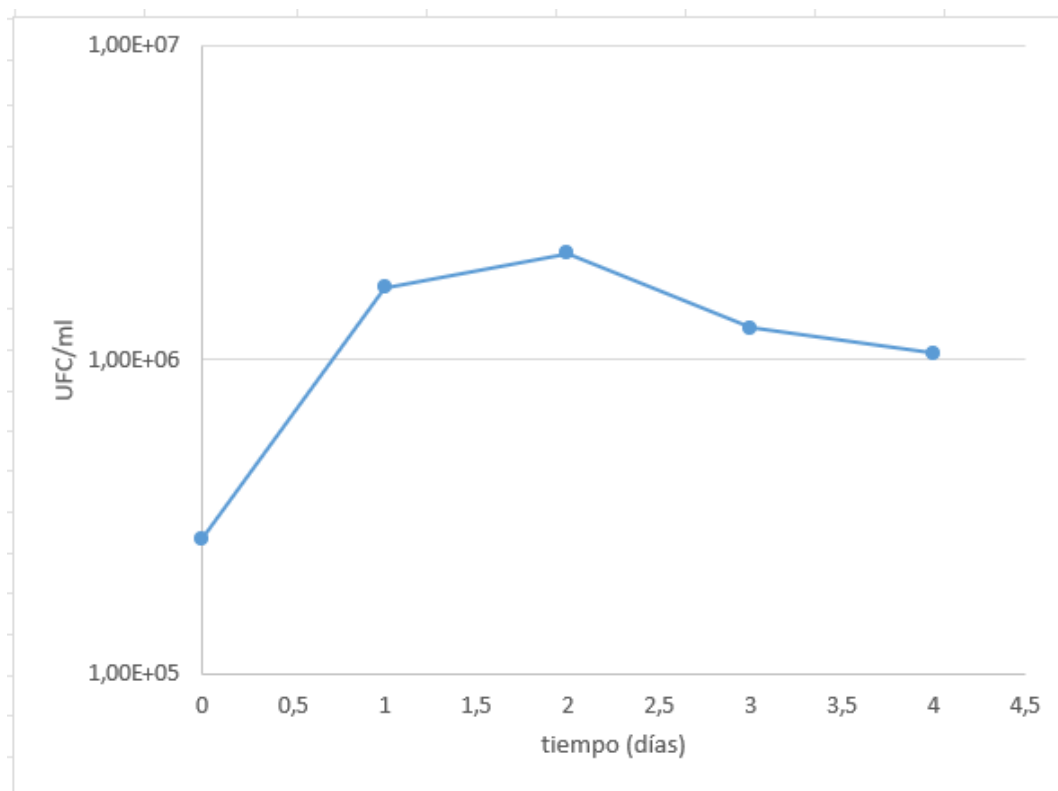


Figura 15. Crecimiento de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* durante la fermentación alcohólica.

4.1.2 Consumo de azúcares totales y reductores

El contenido de azúcar es un parámetro importante para tener en cuenta la producción de vinagre, porque está directamente relacionada con la concentración de alcohol que alcanzará durante la fermentación alcohólica y, por lo tanto, la acidez final.

La gráfica de la figura 16 representa la cantidad de azúcares residuales que están presentes en la fase de fermentación alcohólica. Se observan las mediciones de las dos botellas que teníamos el cacao con el inóculo de la levadura *S. cerevisiae*, (Botella A y botella B). En ambas sigue una distribución del contenido de azúcares similar.

En la fermentación alcohólica se observa una cantidad más elevada al principio que al final y esto es lógico dado que la levadura consume los azúcares durante el proceso de fermentado. La cantidad inicial muestra un contenido de azúcares de 34.000 mg/L, finalizando con unos 15.000 mg/L, lo que representa un consumo de azúcares de alrededor de 19 g/L.

En otras fermentaciones alcohólicas, utilizando como materia prima la remolacha azucarera, el azúcar total parte de cantidades bastante más elevadas, alrededor de 150 g/L o 300 g/L dependiendo de la materia prima, y la levadura consume una media de un 80-90% de los azúcares iniciales. En este caso el consumo de azúcar se muestra mucho inferior (Beigbeder et al., 2021).

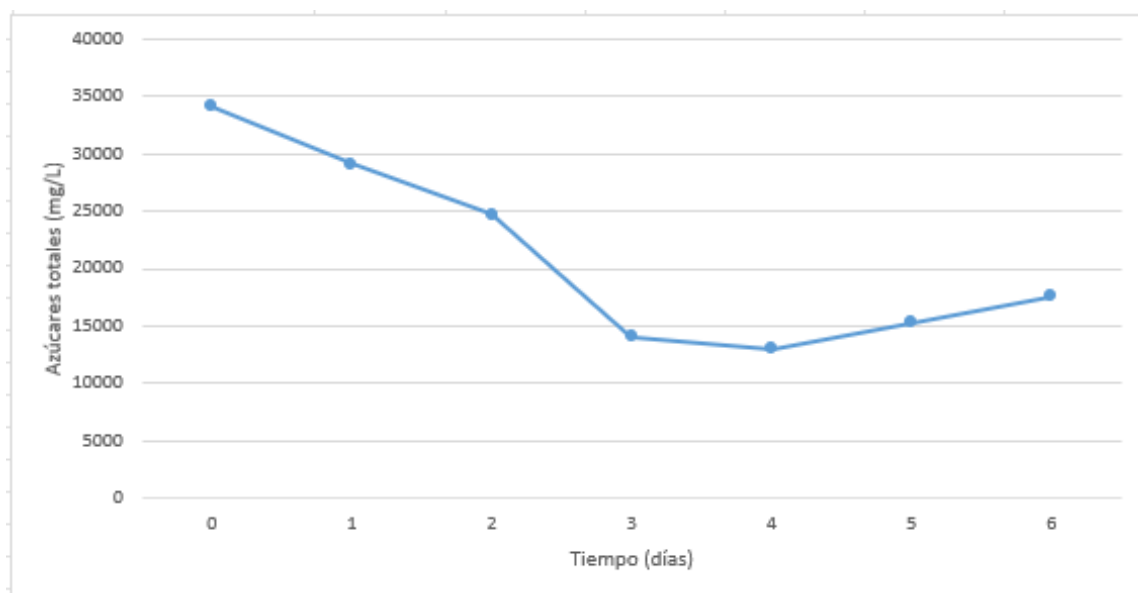


Figura 16. Concentración de azúcares totales medidos en diferentes días durante la fermentación alcohólica.

En la cuantificación de azúcares reductores medidos por método DNS, observamos también la disminución en el contenido de azúcares como consecuencia del consumo de azúcares por la levadura (Figura 17)

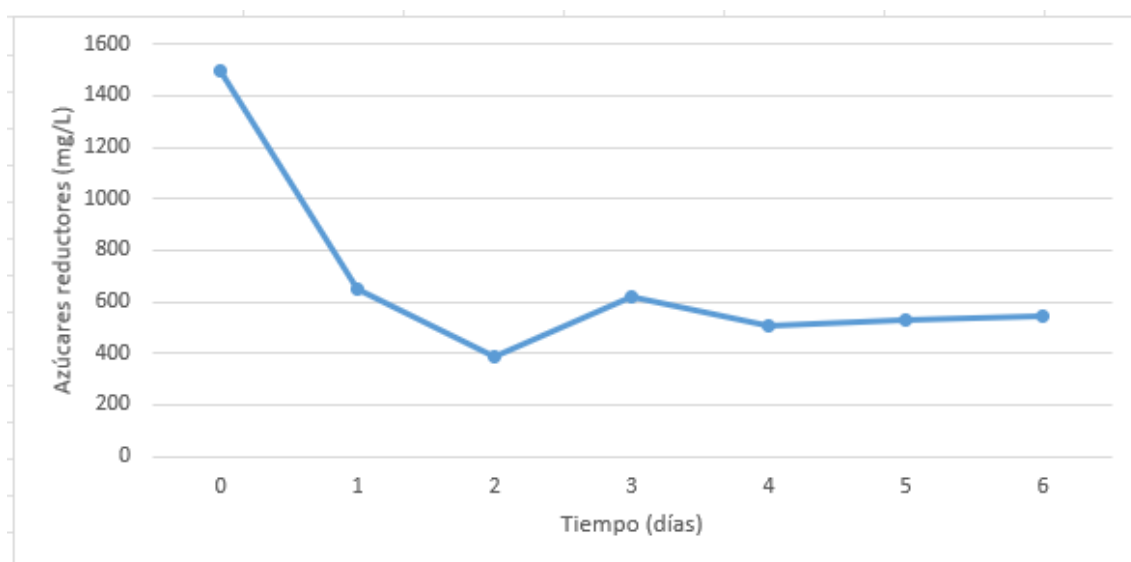


Figura 17. Cantidad de azúcares reductores medidos en mg/L en diferentes días durante la fermentación alcohólica

Se observa que al final de la fermentación existe un remanente de unos 600 mg/L de azúcares reductores. Un comportamiento similar fue observado (Mamen & Abdessemed, 2023) durante la producción de vinagre a partir del higo chumbo, fruta endémica de Mexico, con contenidos de azúcares reductores entre 600 y 1500 mg/L al final de las fermentaciones.

4.1.3 Evolución pH

Para evaluar el pH durante los procesos de fermentación alcohólica y acética, se empleó un método estandarizado utilizando un pH-metro digital calibrado (Figura 6). Durante la fermentación alcohólica se observa una disminución de pH de 4.95 a 4.65, produciéndose un ligero aumento el último día de fermentación (Figura 18).

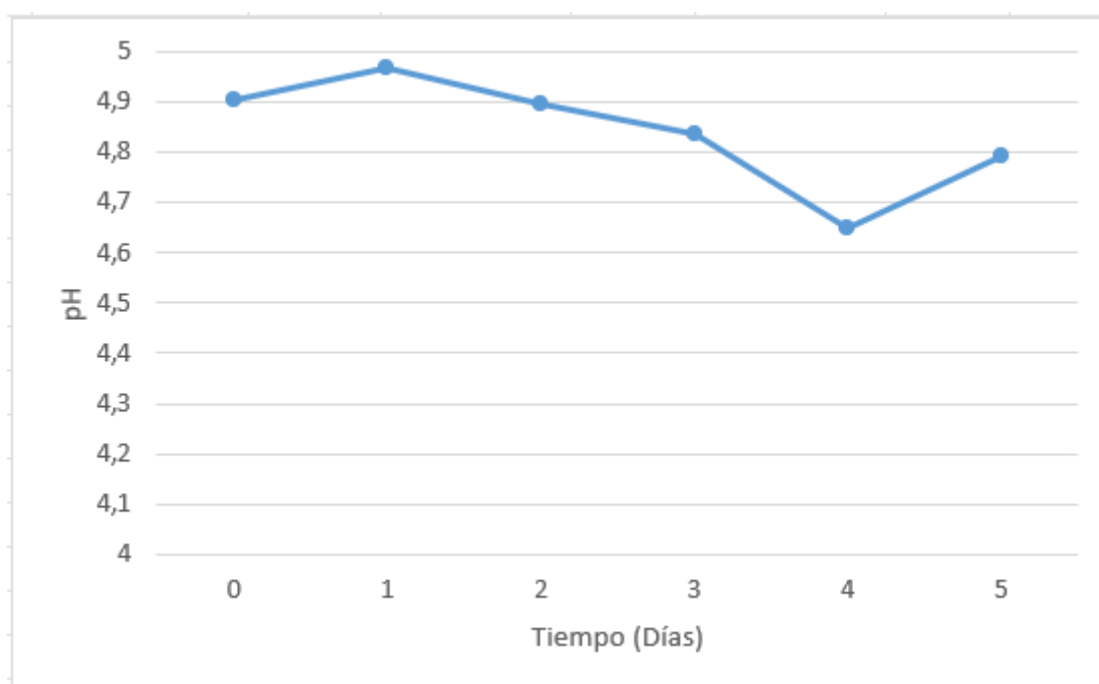


Figura 18. Gráfica medición de pH durante la etapa de fermentación alcohólica

Ocurre un comportamiento similar en cuanto a la disminución del pH a lo largo de esta etapa en otras fermentaciones alcohólicas, como en la elaboración de mosto a partir de uva (Akin et al., 2008) o en la fermentación en la elaboración de sidra donde se generan compuestos ácidos orgánicos (Mu et al., 2023)

4.1.4 Producción de etanol

Las mediciones de etanol se obtuvieron por análisis de cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC). Las concentraciones de etanol que se obtienen generalmente durante un proceso de fermentación alcohólica varían entre 4% y 10% (v/v), dependiendo principalmente del contenido inicial en azúcares y de la eficacia del proceso fermentativo (Puligundla et al., 2011).

Como muestra la Figura 19, la concentración de etanol más alta obtenida en este trabajo se obtuvo el día 4 de fermentación, y fue tan solo del 0,25% (v/v), que se corresponde con una concentración de etanol de 1,97 g/L. Considerando la ecuación simplificada para la fermentación de glucosa que se indica a continuación, considerando una eficacia del 100% cada mol de azúcar daría dos moles de etanol.

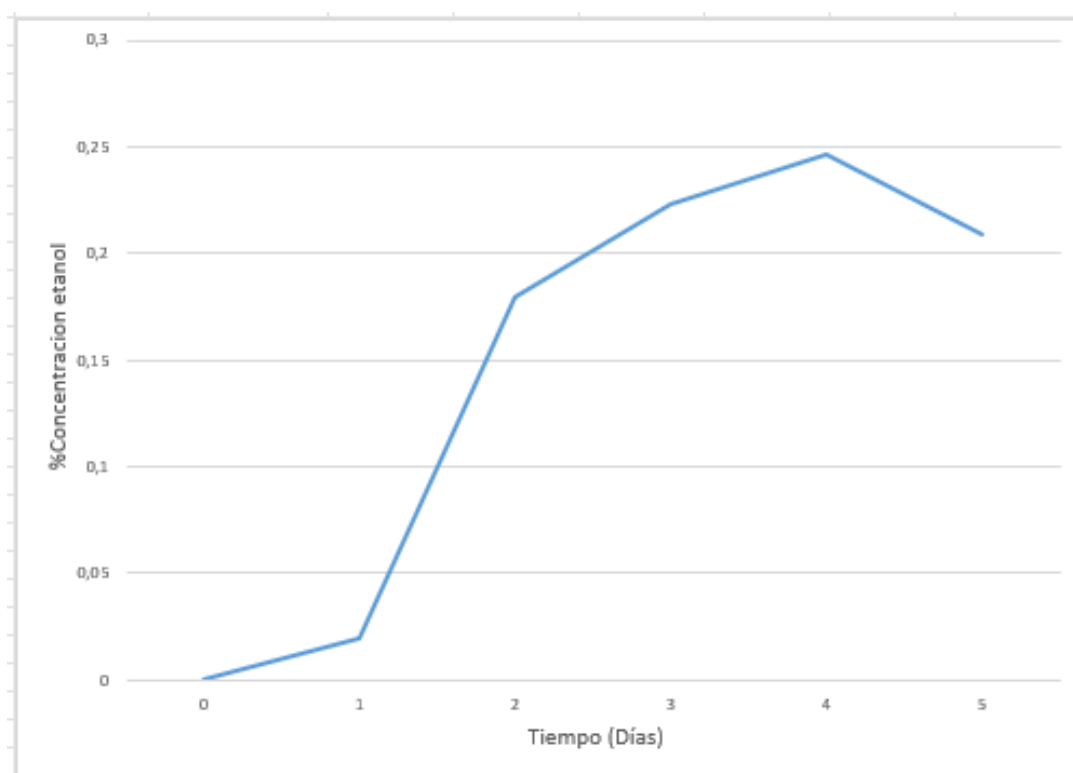
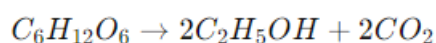


Figura 19. Gráfica % concentración (v/v) de etanol medido por HPLC en la fermentación alcohólica.

Así, se puede calcular que tan solo 3,85 g/L de azúcar se convirtieron en etanol. Comparándolo con el consumo de azúcares calculado a partir de la figura 16 (19 g/L), se obtiene una eficacia de conversión de los azúcares en etanol de tan solo el 20%. En una

fermentación óptima el rendimiento experimental se encuentra entre el 90% y el 95% del teórico (Vázquez, 2007).

La respuesta a esta eficacia tan baja podría ser debida a errores en el procedimiento que dieran lugar a la oxigenación del medio (Snoek y Steensma, 2007), que daría lugar a la activación de la respiración por parte de las levaduras en detrimento de la formación de etanol. El insuficiente crecimiento de la levadura como se mostró en la Figura 16, también podría ser indicador de la reducida actividad metabólica en el medio dando como resultado poca producción de etanol como sustrato final.

4.2 Fermentación acética

4.2.1 Crecimiento de *Acetobacter aceti*

Durante la fermentación acética, las bacterias acéticas oxidan el etanol y lo transforman en ácido acético en condiciones de aerobiosis. Es el proceso más importante de la producción del vinagre.

Tras la fermentación alcohólica se inoculó la bacteria *A. aceti* y se continuó la fermentación a 30°C con 250 rpm para asegurar la aireación del medio. Las muestras se tomaron a partir del día 7 desde la primera fermentación. Se tomó una muestra por triplicado los días 7, 8, 9, 10 y 13 de dos matraces incubados en paralelo.

Como muestra la Figura 20, el microorganismo aumenta un orden de magnitud su población hasta alcanzar la fase estacionaria con una concentración máxima aproximada de 10^6 UFC/mL. Durante la siembra en placa se observaron colonias de otros microorganismos, indicadoras de contaminación, lo que dificultó la cuantificación de la bacteria acética.

La figura 21 muestra el crecimiento de bacterias ácido acéticas en una curva de crecimiento de fermentación óptima. Podemos observar un crecimiento de la bacteria similar en ambas gráficas hasta el día 10, en la cual, en la figura 20, se muestra un descenso marcado del crecimiento, en cambio en el estudio de (Mounir et al., 2021) continúa aumentando hasta alcanzar los 10^8 UFC/mL. Puede deberse a una posible contaminación del medio que haga disminuir su crecimiento o por la poca disponibilidad producida de etanol de la fermentación anterior.

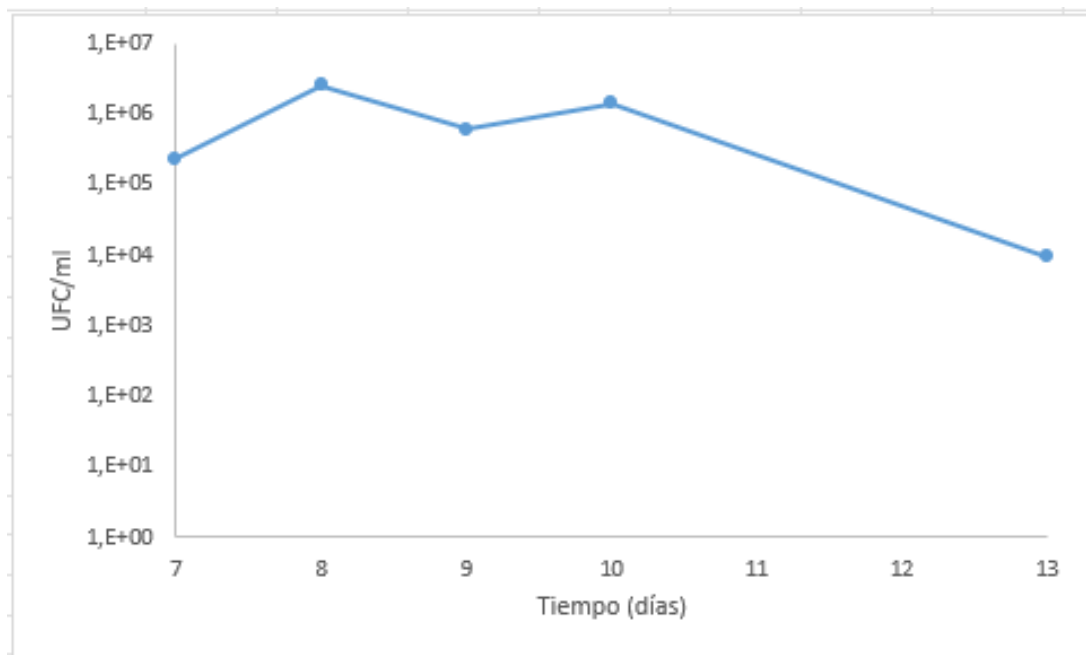


Figura 20. Crecimiento bacteria *Acetobacter aceti* durante la fermentación acética.

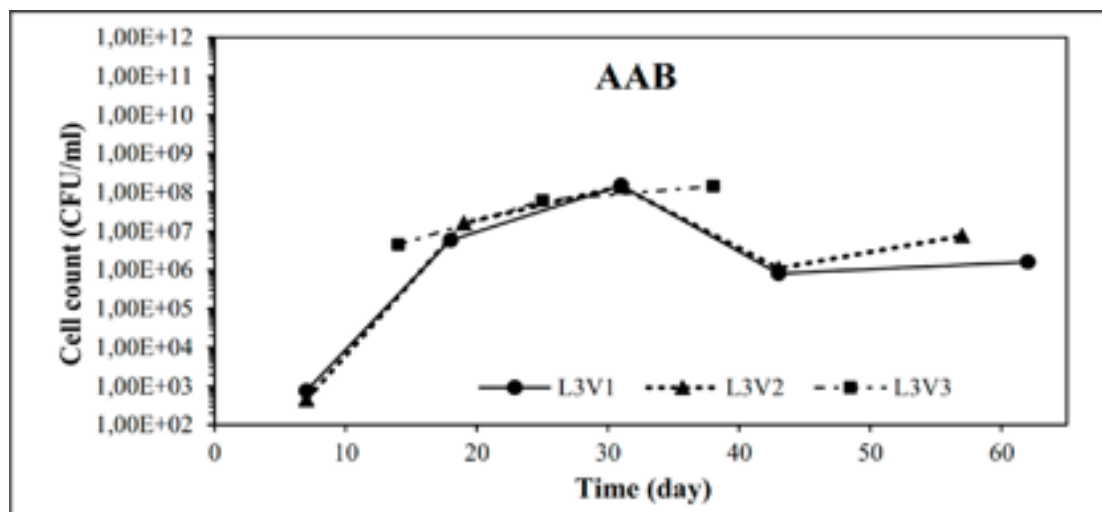


Figura 21. Crecimiento bacterias ácido acéticas en fermentación óptima. Fuente: (Mounir et al.,2021)

4.2.2 Consumo azúcares totales y reductores

La figura 22, muestra la evolución de los azúcares totales durante la fermentación acética. Los inicios de la fermentación muestran una concentración de azúcares totales de alrededor de 18.000 mg/L, y termina con un contenido próximo a 10.000 mg/L.

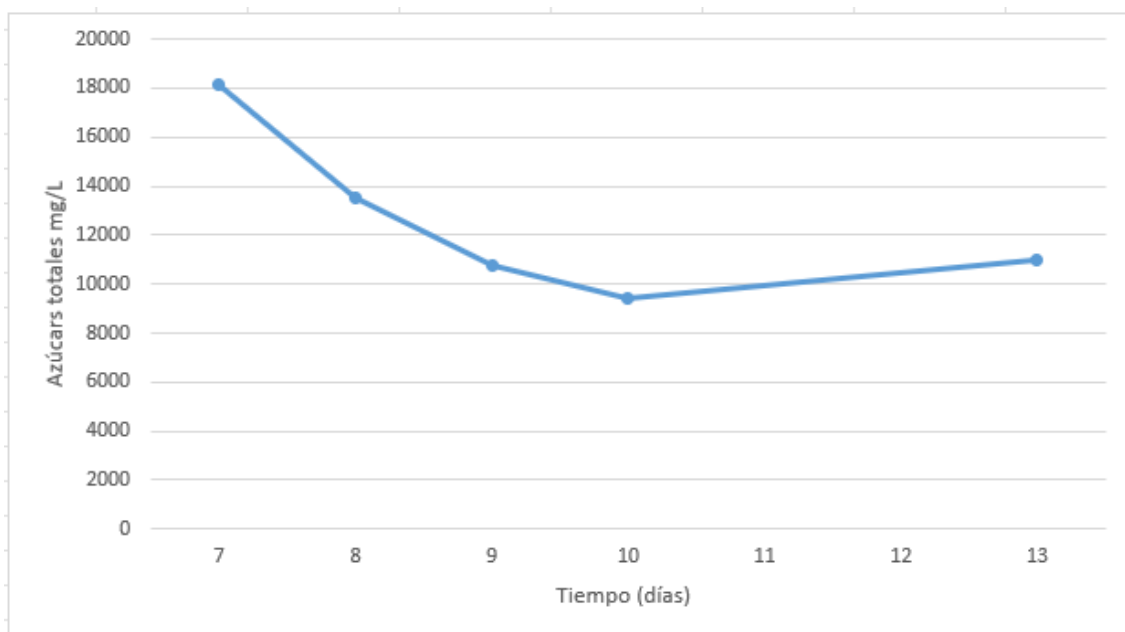


Figura 22. Cantidad de azúcares totales medidos en mg/L en diferentes días durante la fermentación acética

La figura 22 muestra la cuantificación de azúcares reductores durante la etapa de fermentación acética.

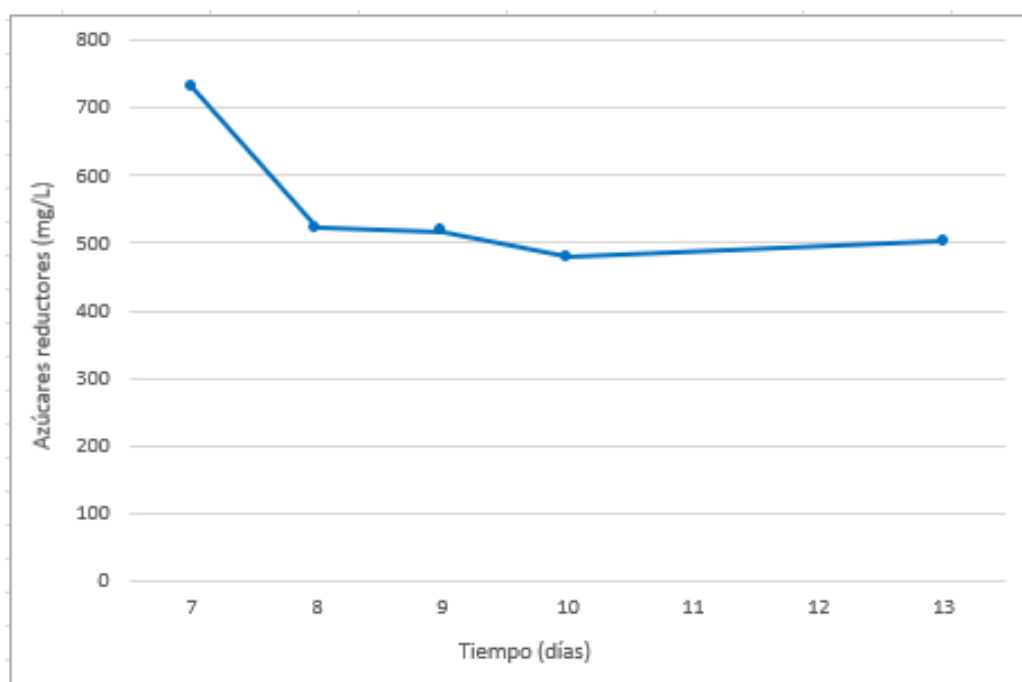


Figura 23. Cantidad de azúcares reductores medidos en mg/L en diferentes días durante la fermentación acética

En otros estudios como en el de Mamen y Abdessemed (2023) el contenido de azúcares reductores al inicio de la fermentación acética está alrededor de 1500 mg/L, y finaliza con menos de 200 mg/L para la producción de vinagre a partir de higo chumbo. Aquí se parte aproximadamente de la mitad del contenido en azúcares reductores y al final quedan más del doble. Sin embargo, hay que tener en cuenta que los azúcares complejos están hidrolizándose en azúcares reductores al tiempo que estos están siendo consumidos, con lo que teniendo en cuenta la reducción experimentada por los azúcares totales, el consumo fue de aproximadamente 8000 mg/L.

4.2.3 Evolución pH

En la elaboración de vinagre las bacterias acéticas tienen un metabolismo estrictamente aeróbico y su pH óptimo de crecimiento está entre 5 y 6,5, aunque no tienen dificultad de crecimiento en pH más bajos. La tolerancia de crecimiento a pH más ácido depende de la concentración de etanol, ácido acético y la disponibilidad de oxígeno (Sengun & Karabiyikli, 2011). En la gráfica de la Figura 23 observamos un comienzo de la fermentación con un pH = 4,6 llegando al final de la fermentación a un pH = 6.

Contrariamente a lo que aquí sucede, durante la fermentación acética el pH debería disminuir debido a la producción de ácido acético, tal y como se muestra la Figura 24 donde vemos la disminución del pH a lo largo de la etapa acética de la producción de vinagre añejo (Hou et al., 2023).

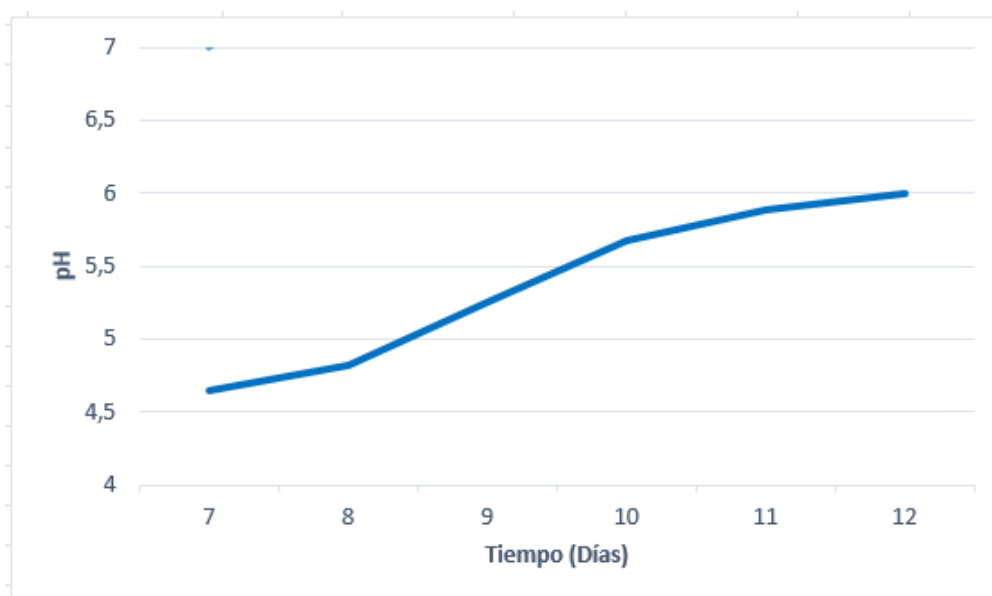


Figura 24. Gráfica medición pH durante la etapa de fermentación acética

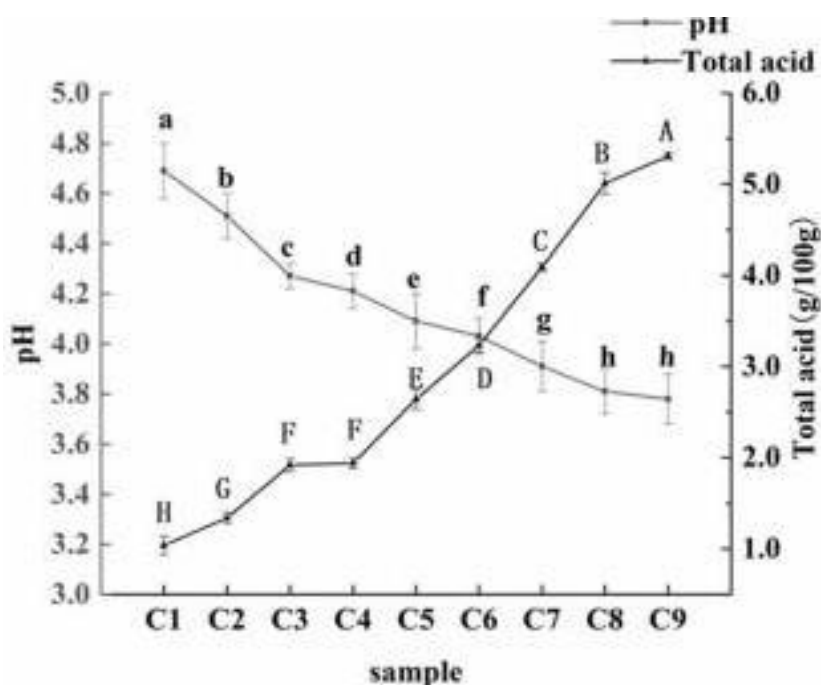
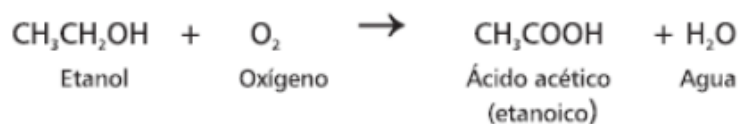


Figura 25. Evolución parámetro pH y ácido total durante el proceso de elaboración del vinagre. Fuente: (Hou et al., 2023)

4.2.4 Producción de ácido acético

En la producción de vinagre, durante la segunda fermentación, el etanol se convierte en ácido acético por acción de las bacterias acéticas. La concentración ideal de etanol al inicio de esta fermentación sería entre 6% y 10% (v/v), que iría disminuyendo a medida que se va transformando en ácido acético (Román-Camacho et al., 2023), según la siguiente ecuación.



Como se ha comentado anteriormente, como consecuencia de una inadecuada fermentación alcohólica, en este trabajo, la concentración de etanol de partida en la fermentación acética fue tan solo del 0,2% (v/v) (1,6 g/L). Así, considerando que todo el etanol se transformara en ácido acético, su concentración tan solo aumentaría en 2 g/L.

La Figura 25 muestra la gráfica con la concentración de ácido acético medida durante la fermentación acética. Se parte de una concentración de 0,3 g/L que aumenta en el día 8 de fermentación hasta 0,5 g/L para luego disminuir por debajo de 0,1 g/L.

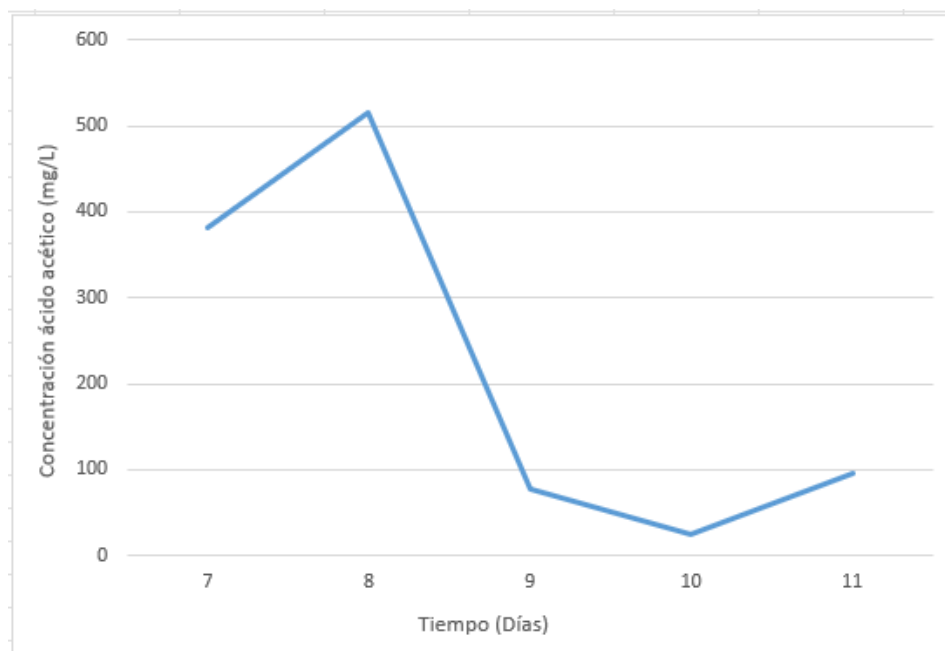


Figura 26. Gráfica concentración ácido acético en la fermentación acética

La concentración de ácido acético al inicio de esta etapa de fermentación puede deberse a la posible hidrólisis de compuestos precursores presentes en el medio de cultivo como polisacáridos (Gullo et al., 2014). Puede ser también debida a una rápida oxidación del etanol durante los últimos días de la fermentación alcohólica. Esta explicación estaría de acuerdo con la reducción en la concentración de etanol observada el día 5 de fermentación alcohólica (Figura 19).

Para obtener altas eficacias en la transformación del etanol, es necesaria una distribución del aire homogénea dentro de la etapa de fermentación acética (Spinosa et al., 2015). Sin embargo, una excesiva aireación combinada con una alta temperatura puede provocar la pérdida de ácidos orgánicos. De hecho, la evaporación de los volátiles durante la fermentación acética es una de las mayores causas de reducción en el rendimiento de producción de ácido acético (Ferreyra et al., 2012). Teniendo en cuenta que, en este trabajo, la fermentación acética se realizó en matraces Erlenmeyer con un elevado espacio de cabezas, alta velocidad de agitación y a 30°C, parece bastante factible que la reducción observada en la concentración de ácido acético sea debida a la pérdida del mismo por evaporación.

5 CONCLUSIONES

A continuación, se redactan las conclusiones extraídas de este trabajo en forma de recomendaciones para futuras investigaciones en esta línea.

- ❖ A pesar de que la hidrólisis hidrotérmica consigue que se disponga de una concentración inicial de azúcares totales y reductores de 18 g/L y 1.5 g/L, respectivamente, es demasiado baja para alcanzar un contenido en ácido acético suficiente para que el producto sea considerado vinagre, con lo que sería necesario suplementar con una fuente de azúcar adicional.
- ❖ Es importante evitar la oxigenación del medio durante la fermentación alcohólica, con lo que la experimentación debe de ser diseñada de manera que no se genere un elevado espacio de cabezas al tomar las muestras y se debe evitar una agitación excesiva del medio.
- ❖ No se recomienda prolongar la fermentación alcohólica durante más de 4 días, con el fin de evitar la reducción en el contenido de etanol y reducir el riesgo de contaminación.
- ❖ Puede resultar conveniente realizar una esterilización del medio por filtración entre ambas fermentaciones con el fin de evitar contaminaciones indeseadas.
- ❖ Con el fin de evitar la pérdida por evaporación del ácido acético formado, durante la fermentación acética se recomienda reducir la temperatura y la velocidad de agitación, así como la duración del proceso.

BIBLIOGRAFÍA

- 2024 United Nations Environment Programme. (2024). *Beyond an age of waste Turning rubbish into a resource*. <https://wedocs.unep.org/20.500.11822/44939>
- Abo, B. O., Gao, M., Wang, Y., Wu, C., Ma, H., & Wang, Q. (2019). Lignocellulosic biomass for bioethanol: An overview on pretreatment, hydrolysis and fermentation processes. In *Reviews on Environmental Health* (Vol. 34, Issue 1, pp. 57–68). De Gruyter. <https://doi.org/10.1515/reveh-2018-0054>
- Acosta, N., De Vrieze, J., Sandoval, V., Sinche, D., Wierinck, I., & Rabaey, K. (2018). Cocoa residues as viable biomass for renewable energy production through anaerobic digestion. *Bioresource Technology*, 265, 568–572. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2018.05.100>
- Afrane, G., & Ntiamoah, A. (2011). Use of Pesticides in the Cocoa Industry and Their Impact on the Environment and the Food Chain. In *Pesticides in the Modern World - Risks and Benefits*. InTech. <https://doi.org/10.5772/17921>
- Agus, B. A. P., Mohamad, N. N., & Hussain, N. (2018). Composition of unfermented, unroasted, roasted cocoa beans and cocoa shells from Peninsular Malaysia. *Journal of Food Measurement and Characterization*, 12(4), 2581–2589. <https://doi.org/10.1007/s11694-018-9875-4>
- Akin, H., Brandam, C., Meyer, X. M., & Strehaiano, P. (2008). A model for pH determination during alcoholic fermentation of a grape must by *Saccharomyces cerevisiae*. *Chemical Engineering and Processing: Process Intensification*, 47(11), 1986–1993. <https://doi.org/10.1016/j.cep.2007.11.014>
- Arvelo, M. A., González, D., Delgado, T., Maroto, S., & Montoya, P. (2017). *Estado actual sobre la producción, el comercio y el cultivo del cacao en américa*.
- Balentic, J. P., Ačkar, Đ., Jokic, S., Jozinovic, A., Babic, J., Miličević, B., Ubaric, D., & Pavlovic, N. (2018a). Cocoa Shell: A By-Product with Great Potential for Wide Application. *Molecules* 2018, Vol. 23, Page 1404, 23(6), 1404. <https://doi.org/10.3390/MOLECULES23061404>
- Balentic, J. P., Ačkar, Đ., Jokic, S., Jozinovic, A., Babic, J., Miličević, B., Ubaric, D., & Pavlovic, N. (2018b). Cocoa Shell: A By-Product with Great Potential for Wide

- Application. *Molecules : A Journal of Synthetic Chemistry and Natural Product Chemistry*, 23(6). <https://doi.org/10.3390/MOLECULES23061404>
- Beigbeder, J. B., de Medeiros Dantas, J. M., & Lavoie, J. M. (2021). Optimization of yeast, sugar and nutrient concentrations for high ethanol production rate using industrial sugar beet molasses and response surface methodology. *Fermentation*, 7(2), 86. <https://doi.org/10.3390/FERMENTATION7020086/S1>
- Blasi, A., Verardi, A., Lopresto, C. G., Siciliano, S., & Sangiorgio, P. (2023). Lignocellulosic Agricultural Waste Valorization to Obtain Valuable Products: An Overview. *Recycling 2023, Vol. 8, Page 61*, 8(4), 61. <https://doi.org/10.3390/RECYCLING8040061>
- Bruna-Maynou, F. J., Castro, R., Rodríguez-Dodero, M. C., Barroso, C. G., & Durán-Guerrero, E. (2020). Flavored Sherry vinegar with citric notes: Characterization and effect of ultrasound in the maceration of orange peels. *Food Research International (Ottawa, Ont.)*, 133. <https://doi.org/10.1016/J.FOODRES.2020.109165>
- Campos-Vega, R., Nieto-Figueroa, K. H., & Oomah, B. D. (2018). Cocoa (*Theobroma cacao* L.) pod husk: Renewable source of bioactive compounds. *Trends in Food Science & Technology*, 81, 172–184. <https://doi.org/10.1016/J.TIFS.2018.09.022>
- CBI Ministry of Foreign Affairs. (2021). *The Spanish market potential for cocoa*.
- Cejudo Bastante, M. J., Durán Guerrero, E., Castro Mejías, R., Natera Marín, R., Rodríguez Dodero, M. C., & Barroso, C. G. (2010). Study of the polyphenolic composition and antioxidant activity of new sherry vinegar-derived products by maceration with fruits. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(22), 11814–11820. <https://doi.org/10.1021/JF1029493>
- de Freitas, E. N., Salgado, J. C. S., Alnoch, R. C., Contato, A. G., Habermann, E., Michelin, M., Martínez, C. A., & Polizeli, M. de L. T. M. (2021). Challenges of Biomass Utilization for Bioenergy in a Climate Change Scenario. *Biology 2021, Vol. 10, Page 1277*, 10(12), 1277. <https://doi.org/10.3390/BIOLOGY10121277>
- De La, J., Medina, C., Vargas Ortiz, M. A., Del, O. A., & Coronel, A. (2011). *CACAO: Operaciones Poscosecha*.

- Diomande, D., Antheaume, I., Leroux, M., Lalande, J., Balayssac, S., Remaud, G. S., & Tea, I. (2015). Multi-element, multi-compound isotope profiling as a means to distinguish the geographical and varietal origin of fermented cocoa (*Theobroma cacao* L.) beans. *Food Chemistry*, *188*, 576–582. <https://doi.org/10.1016/J.FOODCHEM.2015.05.040>
- Dubois, M., Gilles, K. A., Hamilton, J. K., Rebers, P. A., & Smith, F. (1956). *Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances*.
- European Food Information Council (EUFIC). (2021). *Food waste in Europe: statistics and facts about the problem*. <https://www.eufic.org/en/food-safety/article/food-waste-in-europe-statistics-and-facts-about-the-problem>
- FAO/WHO Food Standards Programme. (2010). *Codex Alimentarius: VIDEO*. 2010. <https://agris.fao.org/search/en/providers/122621/records/647396c63ed73003714cef4d>
- Ferreira, W., Disney, D. , Dias, R., Gilberto, , De, V., Pereira, M., Ivani, , Gervásio, M., Rosane, , & Schwan, F. (2009). Indigenous and inoculated yeast fermentation of gabioba (*Campomanesia pubescens*) pulp for fruit wine production. *J Ind Microbiol Biotechnol*, *36*, 557–569. <https://doi.org/10.1007/s10295-009-0526-y>
- Ferreira, M., Schwab, M., Davies, C., Gerard, L., Hours, R., Nacional De Trujillo, U., & Agropecuaria, S. (2012). *Scientia Agropecuaria Facultad de Ciencias Agropecuarias*. www.sci-agropecu.unitru.edu.pe
- Ferronato, N., & Torretta, V. (2019). Waste Mismanagement in Developing Countries: A Review of Global Issues. *International Journal Environmental Research and Public Health*. <https://doi.org/10.3390/ijerph16061060>
- Florencia Melo, M. (2024, March 28). *África: principal productor mundial de cacao | Statista*. <https://es-statista-com.sabidi.urv.cat/grafico/31996/volumen-de-la-produccion-mundial-de-cacao-en-grano/>
- Food and Agriculture Organization of the United Nations. (1996). *The state of food and agricultura 1996: Food Security*. <https://www.fao.org/4/w0073s/w0073s0d.htm>
- Granado-Lorencio, F., & Hernández-Alvarez, E. (2016). *Functional Foods and Health Effects: A Nutritional Biochemistry Perspective*.

- Gul, K., Singh, A. K., & Jabeen, R. (2016). Nutraceuticals and Functional Foods: The Foods for the Future World. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, *56*(16), 2617–2627. <https://doi.org/10.1080/10408398.2014.903384>
- Gullo, M., Verzelloni, E., & Canonico, M. (2014). Aerobic submerged fermentation by acetic acid bacteria for vinegar production: Process and biotechnological aspects. In *Process Biochemistry* (Vol. 49, Issue 10, pp. 1571–1579). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2014.07.003>
- Hidalgo, C., Mateo, E., Mas, A., & Torija, M. J. (2012). Identification of yeast and acetic acid bacteria isolated from the fermentation and acetification of persimmon (*Diospyros kaki*). *Food Microbiology*, *30*(1), 98–104. <https://doi.org/10.1016/J.FM.2011.12.017>
- Hou, Z., Zhang, J., Dang, L., Xue, H., Chen, M., Bai, B., Yang, Y., Bo, T., & Fan, S. (2023). Correlation Analysis of Microbial Community Changes and Physicochemical Characteristics in Aged Vinegar Brewing. *Foods*, *12*(18). <https://doi.org/10.3390/FOODS12183430>
- International Cocoa Organization. (2016). *Quarterly Bulletin of Cocoa Statistics*.
- Inyang, V., Laseinde, O. T., & Kanakana, G. M. (2022). Techniques and applications of lignocellulose biomass sources as transport fuels and other bioproducts. *International Journal of Low-Carbon Technologies*, *17*, 900–909. <https://doi.org/10.1093/IJLCT/CTAC068>
- Ishtar Snoek, I. S., & Yde Steensma, H. (2007). Factors involved in anaerobic growth of *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast (Chichester, England)*, *24*(1), 1–10. <https://doi.org/10.1002/YEA.1430>
- Kaza, S., Yao, L., Bhada-Tata, P., & Woerden, F. Van. (n.d.). *WHAT A WASTE 2.0 A Global Snapshot of Solid Waste Management to 2050 OVERVIEW*.
- Lin, Y., Zhang, W., Li, C., Sakakibara, K., Tanaka, S., & Kong, H. (2014). Factors affecting ethanol fermentation using *Saccharomyces cerevisiae* BY4742. *Biomass and Bioenergy*, *47*, 395–401. <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2012.09.019>
- Lu, F., Rodriguez-Garcia, J., Van Damme, I., Westwood, N. J., Shaw, L., Robinson, J. S., Warren, G., Chatzifragkou, A., McQueen Mason, S., Gomez, L., Faas, L., Balcombe,

- K., Srinivasan, C., Picchioni, F., Hadley, P., & Charalampopoulos, D. (2018). Valorisation strategies for cocoa pod husk and its fractions. *Current Opinion in Green and Sustainable Chemistry*, 14, 80–88. <https://doi.org/10.1016/J.COAGSC.2018.07.007>
- Mamen, D., & Abdessemed, D. (2023). Optimization of Fermentation Factors for Vinegar Production from Prickly Pears using Response Surface Methodology (RSM). *Asian Journal of Dairy and Food Research*, Of. <https://doi.org/10.18805/ajdfdr.drf-332>
- Mankar, A. R., Pandey, A., Modak, A., & Pant, K. K. (2021). Pretreatment of lignocellulosic biomass: A review on recent advances. *Bioresource Technology*, 334, 125235. <https://doi.org/10.1016/J.BIORTECH.2021.125235>
- Mariatti, F., Gunjević, V., Boffa, L., & Cravotto, G. (2021). Process intensification technologies for the recovery of valuable compounds from cocoa by-products. In *Innovative Food Science and Emerging Technologies* (Vol. 68). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2021.102601>
- Martínez, R., Torres, P., Meneses, M. A., Figueroa, J. G., Pérez-Álvarez, J. A., & Viuda-Martos, M. (2012). Chemical, technological and in vitro antioxidant properties of cocoa (*Theobroma cacao* L.) co-products. *Food Research International*, 49(1), 39–45. <https://doi.org/10.1016/J.FOODRES.2012.08.005>
- Ministerio de Agricultura, P. y A. (2013). *Vinagre*. https://www.mapa.gob.es/es/ministerio/servicios/informacion/vinagre_tcm30-102374.pdf
- Morrissey, W. F., Davenport, B., Querol, A., & Dobson, A. D. W. (2004). The role of indigenous yeasts in traditional Irish cider fermentations. *Journal of Applied Microbiology*, 97(3), 647–655. <https://doi.org/10.1111/J.1365-2672.2004.02354.X>
- Mounir, M., Hammoucha, J., Taleb, O., Afechtal, M., Hamouda, A., & Alaoui, M. I. (2021). Inoculation with acetic acid bacteria improves the quality of natural green table olives. *Grasas y Aceites*, 72(2). <https://doi.org/10.3989/GYA.1259192>
- Mu, Y., Zeng, C., Qiu, R., Yang, J., Zhang, H., Song, J., Yuan, J., Sun, J., & Kang, S. (2023). Optimization of the Fermentation Conditions of Huanium Apple Cider and Quantification of Volatile Compounds Using HS-SPME-GC/MS. *Metabolites* 2023, Vol. 13, Page 998, 13(9), 998. <https://doi.org/10.3390/METABO13090998>

- Narendranath, N. V., & Power, R. (2005). Relationship between pH and Medium Dissolved Solids in Terms of Growth and Metabolism of Lactobacilli and *Saccharomyces cerevisiae* during Ethanol Production. *Applied and Environmental Microbiology*, *71*(5), 2239. <https://doi.org/10.1128/AEM.71.5.2239-2243.2005>
- Okiyama, D. C. G., Navarro, S. L. B., & Rodrigues, C. E. C. (2017). Cocoa shell and its compounds: Applications in the food industry. *Trends in Food Science & Technology*, *63*, 103–112. <https://doi.org/10.1016/J.TIFS.2017.03.007>
- Poore, J., & Nemecek, T. (2018). Reducing food's environmental impacts through producers and consumers. *Science*, *360*(6392), 987–992. <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.AAQ0216>
- Puligundla, P., Smogrovicova, D., Obulam, V. S. R., & Ko, S. (2011). Very high gravity (VHG) ethanolic brewing and fermentation: A research update. In *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* (Vol. 38, Issue 9, pp. 1133–1144). <https://doi.org/10.1007/s10295-011-0999-3>
- Quispe-Sanchez, L., Caetano, A. C., Baca, D., Oliva-Cruz, M., Díaz-Valderrama, J. R., & Chavez, S. G. (2023). Fatty acid profile and rheological properties of cocoa paste from north-eastern Peru. *Journal of Food Composition and Analysis*, *123*. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2023.105580>
- Ramos-Escudero, F., Casimiro-Gonzales, S., Cádiz-Gurrea, M. de la L., Cancino Chávez, K., Basilio-Atencio, J., Ordoñez, E. S., Muñoz, A. M., & Segura-Carretero, A. (2023). Optimizing vacuum drying process of polyphenols, flavanols and DPPH radical scavenging assay in pod husk and bean shell cocoa. *Scientific Reports*, *13*(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-023-40815-0>
- Raspor, P., & Goranovič, D. (2008). Biotechnological Applications of Acetic Acid Bacteria. *Critical Reviews in Biotechnology*, *28*(2), 101–124. <https://doi.org/10.1080/07388550802046749>
- Rebollo-Hernanz, M., Zhang, Q., Aguilera, Y., Martín-Cabrejas, M. A., & Gonzalez De Mejia, E. (2019). Relationship of the Phytochemicals from Coffee and Cocoa By-Products with their Potential to Modulate Biomarkers of Metabolic Syndrome In Vitro. *Antioxidants*. <https://doi.org/10.3390/antiox8080279>

- Redgwell, R., Trovato, V., Merinat, S., Curti, D., Hediger, S., & Manez, A. (2003). *Dietary fibre in cocoa shell: characterisation of component polysaccharides*. www.elsevier.com/locate/foodchem
- Röck, M., Saade, M. R. M., Balouktsi, M., Rasmussen, F. N., Birgisdottir, H., Frischknecht, R., Habert, G., Lützkendorf, T., & Passer, A. (2020). Embodied GHG emissions of buildings – The hidden challenge for effective climate change mitigation. *Applied Energy*, 258, 114107. <https://doi.org/10.1016/J.APENERGY.2019.114107>
- Rojo-Poveda, O., Barbosa-Pereira, L., Mateus-Reguengo, L., Bertolino, M., Stévigny, C., & Zeppa, G. (2019). Effects of particle size and extraction methods on cocoa bean shell functional beverage. *Nutrients*, 11(4). <https://doi.org/10.3390/nu11040867>
- Rojo-Poveda, O., Barbosa-Pereira, L., Zeppa, G., & Stévigny, C. (2020). Cocoa Bean Shell—A By-Product with Nutritional Properties and Biofunctional Potential. *Nutrients* 2020, Vol. 12, Page 1123, 12(4), 1123. <https://doi.org/10.3390/NU12041123>
- Román-Camacho, J. J., García-García, I., Santos-Dueñas, I. M., García-Martínez, T., & Mauricio, J. C. (2023). Latest Trends in Industrial Vinegar Production and the Role of Acetic Acid Bacteria: Classification, Metabolism, and Applications—A Comprehensive Review. *Foods* 2023, Vol. 12, Page 3705, 12(19), 3705. <https://doi.org/10.3390/FOODS12193705>
- Sachdeva, V., Roy, A., & Bharadvaja, N. (2020). Current Prospects of Nutraceuticals: A Review. *Current Pharmaceutical Biotechnology*, 21(10), 884–896. <https://doi.org/10.2174/1389201021666200130113441>
- Saha, A. (2023). Circular Economy Strategies for Sustainable Waste Management in the Food Industry. *JOURNAL OF RECYCLING ECONOMY & SUSTAINABILITY POLICY* 2023, 2(2), 1–15.
- Sánchez Suárez-Otero, M. (2023). *Aprovechamiento de residuos agroalimentarios. Tratamientos hidrolíticos y fermentativos* [PhD thesis]. Universidad de Oviedo.
- Sengun, I. Y., & Karabiyikli, S. (2011). Importance of acetic acid bacteria in food industry. *Food Control*, 22(5), 647–656. <https://doi.org/10.1016/J.FOODCONT.2010.11.008>

- Solieri, L., & Giudici, P. (2009). Vinegars of the World. *Vinegars of the World*, 1–16. https://doi.org/10.1007/978-88-470-0866-3_1
- Song, N. E., Jeong, D. Y., & Baik, S. H. (2019). Application of indigenous *Saccharomyces cerevisiae* to improve the black raspberry (*Rubus coreanus* Miquel) vinegar fermentation process and its microbiological and physicochemical analysis. *Food Science and Biotechnology*, 28(2), 481. <https://doi.org/10.1007/S10068-018-0489-8>
- Spinosa, W. A., dos Santos Júnior, V., Galvan, D., Fiorio, J. L., & Gomez, R. J. H. C. (2015). Vinegar rice (*Oryza sativa* L.) produced by a submerged fermentation process from alcoholic fermented rice. *Food Science and Technology (Brazil)*, 35(1), 196–201. <https://doi.org/10.1590/1678-457X.6605>
- The Observatory of Economic Complexity (OEC). (2022). *Cocoa Beans (HS: 1801) Product Trade, Exporters and Importers*. 2022. <https://oec.world/es/profile/hs/cocoa-beans>
- Tridge. (2021). *2021 industry report: Cocoa beans*. https://cdn.tridge.com/market_report_report/24/8e/b5/248eb54e641bb3bd67b2e7d4a976929c31509d62/Industry_Report_-_Cocoa_beans.pdf
- Vásquez, Z. S., De Carvalho Neto, D. P., Pereira, G. V. M., Vandenberghe, L. P. S., De Oliveira, P. Z., Tiburcio, P. B., Rogez, H. L. G., Góes Neto, A., & Soccol, C. R. (n.d.). *Biotechnological approaches for cocoa waste management: A review*. <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2019.04.030>
- Vásquez, Z. S., de Carvalho Neto, D. P., Pereira, G. V. M., Vandenberghe, L. P. S., de Oliveira, P. Z., Tiburcio, P. B., Rogez, H. L. G., Góes Neto, A., & Soccol, C. R. (2019). Biotechnological approaches for cocoa waste management: A review. *Waste Management*, 90, 72–83. <https://doi.org/10.1016/J.WASMAN.2019.04.030>
- Vázquez, H. J. D. O. (2007). *Fermentación alcohólica: Una opción para la producción de energía renovable a partir de desechos agrícolas*. https://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1405-77432007000400004
- Verardi, A., Blasi, A., Marino, T., Molino, A., & Calabrò, V. (2018). Effect of steam-pretreatment combined with hydrogen peroxide on lignocellulosic agricultural wastes for bioethanol production: Analysis of derived sugars and other by-products.

Journal of Energy Chemistry, 27(2), 535–543.
<https://doi.org/10.1016/J.JECHEM.2017.11.007>

Voora, V., Bermúdez, S., & Larrea, C. (2019). *Global Market Report: Cocoa*.
<https://iisd.org/ssi/>

Waste statistics Statistics Explained. (2023).
<https://ec.europa.eu/eurostat/statisticsexplained/>

Younes, A., & Karboune, S. (2023). Enzymatic generation of cocoa bean shells oligosaccharides and feruloylated oligo/polysaccharides. *Food Bioscience*, 56.
<https://doi.org/10.1016/j.fbio.2023.103296>

Younes, A., Karboune, S., Liu, L., Andreani, E. S., & Dahman, S. (2023). Extraction and Characterization of Cocoa Bean Shell Cell Wall Polysaccharides. *Polymers*, 15(3).
<https://doi.org/10.3390/polym15030745>