

**INFLUENCIA DE UN CULTIVO INICIADOR DE MICROORGANISMOS SILVESTRES EN EL
PERFIL DE COMPUESTOS VOLÁTILES Y NO VOLÁTILES DE LAS SEMILLAS
FERMENTADAS DE *Theobroma cacao* L. PROVENIENTE DEL MUNICIPIO DE LOS ANDES,
SOTOMAYOR, NARIÑO**

**JULIÁN FELIPE MARTÍNEZ
KEVIN MAURICIO MIRAMAG**

**Universidad de Nariño
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales
Programa de Biología
San Juan de Pasto
2022**

**INFLUENCIA DE UN CULTIVO INICIADOR DE MICROORGANISMOS SILVESTRES EN EL
PERFIL DE COMPUESTOS VOLÁTILES Y NO VOLÁTILES DE LAS SEMILLAS
FERMENTADAS DE *Theobroma cacao* L. PROVENIENTE DEL MUNICIPIO DE LOS ANDES,
SOTOMAYOR, NARIÑO**

**JULIÁN FELIPE MARTÍNEZ
KEVIN MAURICIO MIRAMAG**

Asesor

**PABLO FERNÁNDEZ IZQUIERDO,
PhD en Ciencias Biológicas**

**Universidad de Nariño
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales
Programa de Biología
San Juan de Pasto
2022**

NOTA DE RESPONSABILIDAD

“Las ideas y conclusiones aportadas en este trabajo de grado, son responsabilidades exclusivas del autor”
Artículo primero del acuerdo No. 324 de octubre 11 de 1966, emanado por el Honorable Consejo superior de la Universidad de Nariño.

NOTA DE ACEPTACIÓN

PABLO FERNÁNDEZ IZQUIERDO, PhD

Firma Director de Trabajo de Grado

ELIZABETH PORTILLA BARCO

Firma Jurado 1

NELSON H. HURTADO GUTIÉRREZ, PhD

Firma Jurado 2

San Juan de Pasto, 31 de agosto de 2022

Agradecimientos

A la Universidad de Nariño por abrirnos las puertas para continuar con nuestra formación académica, profesional y social. Asimismo, a la Vicerrectoría de Investigaciones e Interacción Social por financiar este proyecto y permitir su ejecución.

Al grupo de investigación en Biotecnología Microbiana por brindarnos las herramientas necesarias para nuestra formación como Biólogos y en especial a nuestro asesor y director del grupo de investigación Pablo Fernández Izquierdo, quien nos ha compartido sus conocimientos, confianza y apoyo.

Agradecemos en forma especial a la profesora Edith Mariela Burbano por su acompañamiento y valiosa asesoría en el desarrollo de este trabajo. A la Corporación para la Investigación Aplicada al Desarrollo (CIAD) y a Frank Herrera por su ayuda en el desarrollo experimental de esta investigación. Y al ingeniero agrónomo Andrés Alvares por su asistencia y apoyo en los procesos realizados en el municipio de Los Andes Sotomayor.

A nuestros padres, por su amor, trabajo y sacrificio en todos estos años, gracias a ustedes hemos logrado llegar hasta aquí y convertirnos en lo que somos. Es un total orgullo y privilegio ser sus hijos. A nuestras hermanas y hermanos por estar siempre presentes, su apoyo fue clave en esta etapa de nuestras vidas.

A nuestros amigos por brindarnos su compañía y colaboración en el transcurso de nuestra formación como profesionales.

Y a todas las personas que nos han apoyado y han hecho que este trabajo se realice con éxito.

Dedicatoria

A toda mi familia, amigos y seres queridos por acompañarme en este proceso de formación profesional, infinitas gracias por su apoyo.

Julian Martínez

A toda mi familia, en especial a mis padres y hermano que me brindaron lo mejor de cada uno, su compañía y apoyo hicieron que esto sea posible.

Kevin Miramag

Resumen

Introducción: La fermentación de cacao es un paso esencial para la obtención de semillas con buena calidad, puesto que durante esta etapa se establecen criterios fundamentales como el nivel de acidez atribuido por ácidos orgánicos no volátiles y la formación de compuestos volátiles que contribuyen como precursores específicos de sabor y aroma. En las fases del proceso fermentativo intervienen diferentes microorganismos que cumplen con un papel determinante en la formación de dichos compuestos, es así que el desarrollo de cultivos iniciadores se ha planteado como un importante objeto de estudio para el mejoramiento de la fermentación de cacao.

Objetivo: En el municipio de los Andes Sotomayor, Nariño, la fermentación de cacao se realiza de forma artesanal, sin control sobre los factores que inciden en el aroma y sabor, por lo cual se obtienen variaciones en la calidad del producto final que afectan su comercialización. En consecuencia, en esta investigación se evaluó el efecto de un cultivo iniciador compuesto por microorganismos silvestres aislados de fermentaciones realizadas en esta región.

Metodología: Para el desarrollo del cultivo iniciador se seleccionaron los aislados microbianos que presentaron las siguientes características: levaduras con el mayor crecimiento en un medio con pectina a 1% y mayor actividad de las enzimas pectina metilesterasa y pectina liasa; bacterias ácido lácticas con metabolismo heterofermentativo, baja producción de ácido láctico y mayor crecimiento en un medio con mucílago de cacao; y por último, bacterias ácido acéticas con capacidad de oxidar acetato y lactato a diferentes concentraciones, baja producción de ácido acético y mayor crecimiento en un medio con mucílago de cacao. Para confirmar la identidad de los aislados de interés se utilizaron técnicas de biología molecular y para evaluar la influencia del cultivo iniciador sobre el perfil de compuestos volátiles y no volátiles, se utilizaron análisis cromatográficos que permitieron seguir la dinámica de los compuestos a lo largo de la fermentación en 3 tratamientos diferentes.

Resultados: El cultivo iniciador se conformó por los siguientes aislados: *Saccharomyces cerevisiae* LEV 79, *Pichia kudriavzevii* L51, *Levilactobacillus brevis* BL06 y *Acetobacter okinawensis* BA10. Los análisis de HPLC indicaron la capacidad del cultivo iniciador para disminuir la concentración de ácidos orgánicos durante la fermentación y los análisis de GC-MS demostraron que los microorganismos seleccionados influyen de manera positiva en el perfil de compuestos volátiles, al inducir una mayor producción de alcoholes, ésteres, aldehídos, cetonas, hidrocarburos y terpenos en comparación con los resultados de fermentación bajo condiciones artesanales.

Palabras clave: *Theobroma cacao* L., Fermentación de cacao, Cultivo iniciador, Compuestos volátiles y no volátiles, RFLP

Abstract

Introduction: Cocoa fermentation is an essential step to obtain good quality seeds, since during this stage fundamental criteria are established, such as the level of acidity attributed by non-volatile organic acids and the formation of volatile compounds that contribute as specific precursors of flavor and aroma. In the phases of the fermentation process, different microorganisms play a determining role in the formation of these compounds, so the development of starter cultures has been considered as an important object of study for the improvement of cocoa fermentation.

Objective: In the municipality of Los Andes Sotomayor, Nariño, cocoa fermentation is carried out in an artisanal way, without control over the factors that affect aroma and flavor, which results in variations in the quality of the final product that affect its commercialization. Consequently, in this investigation the effect of a starter culture composed of wild microorganisms isolated from fermentations carried out in this region was evaluated.

Methodology: For the development of the starter culture, the microbial isolates that presented the following characteristics were selected: yeasts with the highest growth in a medium with 1% pectin and the highest activity of the enzymes pectin methyl esterase and pectin lyase; lactic acid bacteria with heterofermentative metabolism, low production of lactic acid and, greater growth in a medium with cocoa mucilage; and finally, acetic acid bacteria with the ability to oxidize acetate and lactate at different concentrations, low production of acetic acid and, greater growth in a medium with cocoa mucilage. To confirm the identity of the isolates of interest, molecular biology techniques were used and to evaluate the influence of the starter culture on the profile of volatile and non-volatile compounds, chromatographic analyzes were used to follow the dynamics of the compounds throughout the fermentation in 3 different treatments.

Results: The starter culture was made up of the following isolates: *Saccharomyces cerevisiae* L79, *Pichia kudriavzevii* L51, *Levilactobacillus brevis* BL06 and *Acetobacter okinawensis* BA10. HPLC analyzes indicated the ability of the starter culture to decrease the concentration of organic acids during fermentation and GC-MS analyzes showed that the selected microorganisms positively influence the profile of volatile compounds, by inducing a higher production of alcohols, esters, aldehydes, ketones, hydrocarbons and terpenes compared to the results of fermentation under artisanal conditions.

Keywords: *Theobroma cacao* L., Cocoa fermentation, Starter culture, Volatile and non-volatile compounds, RFLP.

Tabla de contenido

1. Introducción	1
2. Planteamiento del problema	3
3. Justificación	6
4. Marco teórico	8
4.1 <i>Theobroma cacao</i> L.	8
4.2 Calidad de las semillas de cacao	8
4.3 Compuestos no volátiles	9
4.4 Compuestos volátiles	10
4.5 Factores que influyen en la calidad del cacao	14
4.5.1 Efecto del genotipo y ubicación geográfica	14
4.5.2 Pre acondicionamiento de la pulpa	15
4.5.3 Fermentación	16
4.5.4 Secado	17
4.5.5 Tostado	18
4.6 Microorganismos fermentadores	19
4.6.1 Levaduras	19
4.6.2 Bacterias ácido lácticas	20
4.6.3 Bacterias ácido acéticas	21
4.7 Cultivo iniciador	22
5. Estado del arte	24
5.1 Diversidad de microorganismos asociados a la fermentación del cacao	24
5.2 Cultivos iniciadores en la fermentación de cacao.	28
6. Objetivos	30
6.1 Objetivo general	30
6.2 Objetivos específicos	30
7. Metodología	31
7.1 Lugar de muestreo	31
7.2 Aislamiento y purificación de microorganismos	31
7.3 Selección de microorganismos	32
7.3.1 Levaduras	32
7.3.2 Bacterias ácido lácticas y bacterias ácido acéticas	33

7.4 Extracción de ADN y amplificación de la región ITS1-5.8S ARNr-ITS2 y el dominio D1/D2 (26S) de LEV	34
7.5 Extracción de ADN y amplificación del gen 16S de BAL y BAA	35
7.6 Edición de secuencias e identificación de los aislados	36
7.7 Construcción de árboles filogenéticos	36
7.8 Análisis <i>in-silico</i> con cortes con enzimas de restricción	38
7.9 Desarrollo del cultivo iniciador	38
7.10 Diseño experimental de los procesos de fermentación	39
7.11 Extracción y cuantificación de ácidos orgánicos no volátiles	39
7.12 Extracción y cuantificación de compuestos volátiles	40
7.13 Análisis estadístico	40
8. Resultados	42
8.1 Selección de microorganismos con potencial fermentativo para el desarrollo del cultivo iniciador	42
8.1.1 Aislamiento y purificación de microorganismos	42
8.1.2 Selección de microorganismos	42
8.1.2.1 Levaduras.	42
8.1.2.2 Bacterias ácido lácticas.	44
8.1.2.3 Bacterias ácido acéticas.	47
8.2 Caracterización molecular de los microorganismos seleccionados para la formación del cultivo iniciador	50
8.2.1 Levaduras	50
8.2.2 Bacterias ácido lácticas y bacterias ácido acéticas	57
8.3 Análisis <i>in-silico</i> con corte con enzimas de restricción	62
8.4 Desarrollo del cultivo iniciador	67
8.5 Determinación de la concentración de ácidos orgánicos no volátiles producidos en los diferentes tratamientos de fermentación mediante HPLC.	68
8.6 Cuantificación de compuestos volátiles formados en los diferentes tratamientos de fermentación mediante SPME-HS y GC-MS.	70
9. Discusión	77
9.1 Selección de microorganismos con potencial fermentativo para el desarrollo del cultivo iniciador	77
9.1.1 Levaduras	77
9.1.2 Bacterias ácido lácticas	78
9.1.3 Bacterias ácido acéticas	78

9.2 Caracterización molecular de los microorganismos seleccionados para la formación del cultivo iniciador	79
9.2.1 Levaduras	80
9.2.2 Bacterias ácido lácticas	81
9.2.3 Bacterias ácido acéticas	81
9.3 Desarrollo del cultivo iniciador	82
9.4 Determinación de la concentración de ácidos orgánicos no volátiles producidos en los diferentes tratamientos de fermentación mediante HPLC.	83
9.5 Cuantificación de compuestos volátiles formados en los diferentes tratamientos de fermentación mediante SPME-HS y GC-MS.	85
10. Conclusiones	88
11. Recomendaciones	90
12. Referencias	91
13. Anexos	114

Índice de Figuras

Figura 1. Agrupación de LEV por el método k-medias respecto a la actividad enzimática de PME y el crecimiento en pectina al 1%. Los valores de los ejes se encuentran normalizados para cada variable (fuente: esta investigación).	43
Figura 2. Actividad enzimática de PL de las LEV del grupo 5. Cada color representa un grupo homogéneo (fuente: esta investigación).	44
Figura 3. Producción de CO₂ por parte de las BAL. A) Aislados con metabolismo heterofermentativo, B) Aislado con metabolismo homofermentativo (fuente: esta investigación).	46
Figura 4. Producción de ácido láctico de las BAL heterofermentativas. Cada color representa un grupo homogéneo (fuente: esta investigación).	46
Figura 5. Curvas de crecimiento de las BAL heterofermentativas del grupo B. Las barras representan la desviación estándar (fuente: esta investigación).	47
Figura 6. Producción de ácido acético de las BAA con capacidad de oxidar lactato y acetato a una concentración del 3%. (fuente: esta investigación).	49
Figura 7. Curvas de crecimiento de las BAA con capacidad de oxidar lactato y acetato a una concentración del 3%. Las barras representan la desviación estándar (fuente: esta investigación).	50
Figura 8. Visualización de las muestras de ADN de los aislados de LEV en gel de agarosa a 1%. Muestras de ADN correspondientes de 1 a 20: L09, L10, L20, L27, L28, L32, L33, L34, L35, L36, L37, L44, L51, L58, L64, L67, L68, L69, L73, L79; E: escalera Thermo Scientific™ GeneRuler 1 kb Plus DNA Ladder. (fuente: esta investigación).	51
Figura 9. Visualización de los amplicones de la región ITS1-5.8S ARNr-ITS2 de LEV en gel de agarosa a 1%. Amplicones correspondientes del 1 al 20: L09, L10, L20, L27, L28, L32, L33, L34, L35, L36, L37, L44, L51, L58, L64, L67, L68, L69, L73, L79; E: escalera Thermo Scientific™ GeneRuler 100 bp Plus DNA Ladder. (fuente: esta investigación).	52
Figura 10. Visualización de los amplicones del dominio D1/D2 ARNr (26S) de LEV en gel de agarosa a 1%. Amplicones correspondientes del 1 al 20: L09, L10, L20, L27, L28, L32, L33, L34, L35, L36, L37, L44, L51, L58, L64, L67, L68, L69, L73, L79; E: escalera Thermo Scientific™ GeneRuler 100 bp Plus DNA Ladder. (fuente: esta investigación).	54
Figura 11. Árbol filogenético construido por Neighbor-joining de las secuencias correspondientes a la región ITS1-5.8S rDNA-ITS2 de las LEV identificadas. Los números en los nodos corresponden a valores bootstrap. (fuente: esta investigación).	56

Figura 12. Árbol filogenético construido por Neighbor-joining de las secuencias correspondientes al dominio D1/D2 ARNr (26S) de las LEV identificadas. Los números en los nodos corresponden a valores bootstrap (fuente: esta investigación).....	57
Figura 13. Visualización de las muestras de ADN de los aislados de BAL y BAA en gel de agarosa a 1%. Muestras de ADN correspondientes de 1 a 20: BL02, BL06, BL09, BL11, BL12, BL14, BL17, BL19, BL20, BL23, BA02, BA10, BA11, BA12, BA13, BA14, BA15, BA17, BA18, BA19; E: escalera Thermo Scientific™ GeneRuler 1 kb Plus DNA Ladder (fuente: esta investigación).	58
Figura 14. Visualización de los amplicones de la región 16s ARNr de BAL y BAA en gel de agarosa a 1%. Amplicones correspondientes de 1 a 20: BL02, BL06, BL09, BL11, BL12, BL14, BL17, BL19, BL20, BL23, BA02, BA10, BA11, BA12, BA13, BA14, BA15, BA17, BA18, BA19; E: escalera Thermo Scientific™ GeneRuler 100 bp Plus DNA Ladder (fuente: esta investigación).	59
Figura 15. Árbol filogenético construido por Neighbor-joining de las secuencias correspondientes a la región 16S ARNr de las BAL identificadas. Los números en los nodos corresponden a valores Bootstrap (fuente: esta investigación).	61
Figura 16. Árbol filogenético construido por Neighbor-joining de las secuencias correspondientes a la región 16S ARNr de las BAA identificadas. Los números en los nodos corresponden a valores Bootstrap (fuente: esta investigación).	62
Figura 17. Dendrograma de similitud de las LEV con respecto a las secuencias ITS1-5.8S ARNr-ITS2 mediante el análisis por RFLP. (fuente: esta investigación).	64
Figura 18. Dendrograma de similitud de las LEV con respecto a las secuencias D1/D2 ARNr (26S) mediante el análisis por RFLP (fuente: esta investigación).	65
Figura 19. Dendrograma de similitud de las BAL con respecto a las secuencias 16S ARNr mediante el análisis por RFLP. (fuente: esta investigación).	66
Figura 20. Dendrograma de similitud de las BAA con respecto a las secuencias 16S ARNr mediante el análisis por RFLP. (fuente: esta investigación).	67
Figura 21. Dinámica de los ácidos orgánicos no volátiles en los diferentes tratamientos de fermentación. a) Ácido láctico; b) Ácido oxálico; c) Ácido cítrico; d) Ácido succínico. Las barras representan la desviación estándar. T1 (FN): Fermentación bajo condiciones artesanales en el municipio de Los Andes, Sotomayor; T2 (FN + CI): Fermentación bajo condiciones artesanales con cultivo iniciador en el municipio de Los Andes, Sotomayor; T3 (CI): Fermentación con cultivo iniciador bajo condiciones de laboratorio (fuente: esta investigación).	70
Figura 22. Mapa de calor de los compuestos volátiles identificados en los diferentes tratamientos a lo largo de la fermentación . Grupo químico: Ac: ácido; Alc: alcohol; Ald: aldehído; Cet: cetona;	

**Est: éster; Hid: hidrocarburo; Ter: terpeno. T1-T2-T3:Tratamientos de fermentación. D1-D4-D8:
Días de fermentación (fuente: esta investigación).....71**

**Figura 23. ACP de los compuestos volátiles determinados en los diferentes tratamientos de
fermentación de cacao para el día 1. En el análisis solo se indican los compuestos que aportaron con
el mayor peso para la construcción de los componentes (fuente: esta investigación).72**

**Figura 24. ACP de los compuestos volátiles determinados en los diferentes tratamientos de
fermentación de cacao para el día 4. En el análisis solo se indican los compuestos que aportaron con
el mayor peso para la construcción de los componentes (fuente: esta investigación).73**

**Figura 25. ACP de los compuestos volátiles determinados en los diferentes tratamientos de
fermentación de cacao para el día 8. En el análisis solo se indican los compuestos que aportaron con
el mayor peso para la construcción de los componentes (fuente: esta investigación).74**

Índice de Tablas

Tabla 1. Compuestos volátiles identificados durante el proceso de fermentación y secado de las semillas de cacao. Tomado y modificado de: Rodriguez-Campos et al., (2011) y Utrilla et al., (2019)	11
Tabla 2. Características del sabor de semillas de cacao provenientes de diferentes regiones geográficas. Tomado y modificado de Kongor et al., (2016)	15
Tabla 3. Especies de LEV identificadas durante la fermentación de cacao en diferentes países. Tomado y modificado de Sarbu & Csutak, (2019).....	25
Tabla 4. Especies de bacterias identificadas durante la fermentación de cacao en diferentes países. Tomado y modificado de Sarbu & Csutak, (2019).....	26
Tabla 5. Secuencias de referencia y modelos de sustitución nucleotídica para la construcción de los árboles filogenéticos por Neighbor-joining para cada grupo microbiano.	37
Tabla 6. Actividad enzimática de PME y crecimiento en pectina a 1% de los aislados de LEV.	42
Tabla 7. Tipo de metabolismo de las BAL según la producción de CO ₂	44
Tabla 8. Capacidad de BAA para oxidar lactato a diferentes concentraciones.	48
Tabla 9. Identificación molecular de las LEV de acuerdo con la región ITS1-5.8S ARNr-ITS2.	53
Tabla 10. Identificación molecular de LEV aisladas de cacao de acuerdo con el dominio D1/D2 ARNr (26S).	55
Tabla 11. Identificación molecular de las BAL de acuerdo con la región 16S ARNr	60
Tabla 12. Identificación molecular de las BAA de acuerdo con la región 16S ARNr	60
Tabla 13. Enzimas de restricción seleccionadas para realizar los ensayos in-silico de RFLP ..	63
Tabla 14. Producción de ácidos orgánicos en tres tratamientos de fermentación de cacao	68
Tabla 15. Compuestos volátiles determinados en los diferentes tratamientos al final de la fermentación.....	74

1. Introducción

El cultivo de cacao se ha extendido en diferentes áreas a lo largo del trópico debido a la importancia económica de las semillas, las cuales constituyen la materia prima para diferentes sectores industriales y en especial para el encargado de la producción de chocolate (Wickramasuriya & Dunwell, 2018). A nivel mundial, cerca de 6 millones de agricultores contribuyen para una producción anual estimada en 4 millones de toneladas, que representan la fuente de ingresos para más de 40 millones de personas (Afoakwa, 2014; Voora et al., 2019).

El incremento en la demanda de cacao ha generado que la comercialización de las semillas dependa en gran medida de las características organolépticas que las clasifican en dos tipos: cacao estándar y cacao fino de sabor y aroma (Sukha et al., 2008). De tal forma, el análisis sensorial de las semillas influenciado por el perfil de compuestos volátiles y no volátiles, es un criterio determinante en la aceptabilidad y el valor económico del cacao en el mercado (Calvo et al., 2021). Sin embargo, desarrollar un perfil sensorial adecuado es complejo y depende de diversos factores, entre los cuales, la fermentación juega el papel más importante para el desarrollo de estos atributos (Santander-Muñoz et al., 2020).

En Colombia, actualmente el sector cacaotero se caracteriza porque 95% de su base social productiva está representada por pequeños productores. En consecuencia, existe una amplia heterogeneidad en la calidad de las semillas, debido a que las condiciones implementadas en los procesos de fermentación no tienen ningún tipo de control y varían de un lugar a otro. A esta situación se suma la deficiente infraestructura y la ausencia de programas que capaciten a los productores para aprovechar el alto potencial que tiene el país en la producción de cacao fino de sabor y aroma (Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural., 2021).

Bajo este contexto, una de las metas del sector cacaotero es definir metodologías que permitan controlar la fermentación, puesto que la obtención de semillas de cacao con mayor calidad aumenta la probabilidad de comercialización dentro de las cadenas nacionales e internacionales (Escobar et al., 2021). Entre las estrategias para la estandarización de este proceso, la implementación de cultivos iniciadores microbianos que incluyen levaduras (LEV), bacterias ácido lácticas (BAL) y bacterias ácido acéticas (BAA), se han propuesto como un mecanismo para aumentar la eficiencia del proceso de fermentación e inducir características sensoriales deseables (Crafack et al., 2013; Pereira et al., 2020; Sandhya et al., 2016).

En esta investigación, se establecieron diferentes criterios de selección para desarrollar un cultivo iniciador compuesto por microorganismos aislados de fermentaciones realizadas bajo condiciones artesanales en el municipio de Los Andes, Sotomayor, Nariño; con el objetivo de evaluar su influencia en el perfil de compuestos volátiles y no volátiles de las semillas de cacao fermentadas. Los resultados permitieron identificar un aporte tecnológico importante, ya que el cultivo iniciador se desarrolló con bacterias que comúnmente no se han implementado en cultivos iniciadores y con LEV que presentaron capacidad enzimática de pectina metilesterasa (PME) y pectina liasa (PL). Asimismo, se resalta el perfil cualitativo y cuantitativo de los compuestos volátiles y no volátiles en las semillas fermentadas con cultivo iniciador como un primer avance para la producción de cacao fino de sabor y aroma. Por último, se contribuye al conocimiento de la biodiversidad de microorganismos asociados a la fermentación de cacao en el departamento de Nariño, con el registro de los aislados en la Colección Microbiológica de la Universidad de Nariño (código RNC: 256) y la publicación de secuencias genómicas en la base de datos *GenBank* del *National Center for Biotechnology Information* (NCBI).

2. Planteamiento del problema

Theobroma cacao L. probablemente se originó en áreas neotropicales (Badrie et al., 2015; Motamayor et al., 2008), además cuenta con una amplia diversidad genética entre las fronteras de Brasil, Perú, Ecuador y Colombia (Cornejo et al., 2018; Thomas et al., 2012). Los frutos de cacao maduros contienen de 30 a 40 semillas recubiertas por una pulpa mucilaginosa, la cual es un componente importante en los tratamientos post cosecha, ya que cuenta con aproximadamente el 13% p/p de azúcares fermentables (Lefebvre et al., 2010; Lima et al., 2011); una alta acidez (pH 3.0–3.5) conferida por la presencia de diversos ácidos orgánicos, principalmente ácido cítrico (Guehi et al., 2010); un contenido proteico cercano a 0.6% p/p; pectina y otros compuestos (Lima et al., 2011). Actualmente, la planta de cacao se cultiva en diferentes zonas húmedas al nivel del trópico y representa un componente importante en la economía mundial debido al valor de sus semillas (Krämer et al., 2015; Osorio-Guarín et al., 2017).

Dentro de la cadena del valor del cacao es fundamental el cumplimiento de los diferentes estándares de calidad que determinan su comercialización, entre los principales criterios para evaluar las semillas de cacao, se tiene que el perfil cualitativo y cuantitativo de los compuestos volátiles y no volátiles es un aspecto de alto interés (Krämer et al., 2015). Por cuanto las notas características de sabor y aroma se relacionan directamente con el tipo y concentración de compuestos volátiles y el exceso de compuestos no volátiles como el ácido cítrico, láctico, succínico y oxálico disminuyen significativamente la calidad de las semillas fermentadas (Frauendorfer & Schieberle, 2008; Magi et al., 2012). Adicionalmente, existen diferentes factores como el genotipo de la planta, las condiciones ambientales, las prácticas agrícolas y los tratamientos postcosecha como el pre acondicionamiento de la pulpa, fermentación, secado y tostado, que influyen sobre la formación de estos compuestos y definen la calidad del producto final (Afoakwa, 2016; Kongor et al., 2016; Owusu et al., 2012).

Las semillas obtenidas directamente del fruto de cacao presentan características sensoriales no deseables, por tanto, los procesos postcosecha son necesarios para su tratamiento (Wood & Lass, 2001). Entre estos, la fermentación se considera como el factor más importante (Batista et al., 2016; Mendoza-Salazar et al., 2022; Schwan & Wheals, 2004), ya que durante esta etapa se desarrolla el color de las semillas, hay una reducción significativa de la amargura y astringencia, se determina la concentración de acidez y se inicia la formación de compuestos volátiles que contribuyen como precursores de sabor y aroma (Ganeswari et al., 2015; Lagunes-Gálvez et al., 2007). Un proceso de fermentación realizado de manera inadecuada, inhibe la formación de compuestos específicos y aumenta la probabilidad de rechazo de las semillas en el medio comercial (Afoakwa, 2016). Al investigar la fermentación del cacao, varios estudios se han centrado en la

identificación de los grupos microbianos involucrados y en las funciones que cumplen a medida que cambia el microambiente del proceso (Jespersen et al., 2005; D. Nielsen et al., 2013; Sarbu & Csutak, 2019). De esta manera, se describe una fase inicial anaeróbica dominada por LEV y BAL, seguida de una fase aeróbica que favorece el crecimiento de BAA (Ziegler, 2009).

Entre las funciones de estos microorganismos, se encuentran importantes procesos metabólicos que influyen significativamente en la forma en que se desarrolla la fermentación y las propiedades organolépticas de las semillas de cacao (Escobar et al., 2021; Kratzer et al., 2009). Por su parte, algunas LEV cuentan con una eficiente actividad enzimática que facilita la degradación de pectina presente en el mucílago y acelera el proceso de fermentación (Ho et al., 2014), además de contribuir con la producción de etanol y una amplia gama de compuestos volátiles (Pereira et al., 2017). En cuanto a las BAL, se tiene que, aquellas especies con un metabolismo heterofermentativo presentan la capacidad de producir compuestos volátiles importantes como 2 y 3 metilbutanal, fenilacetaldehído, entre otros; y debido a su consumo de ácido cítrico y baja producción de ácido láctico, contribuyen con el aumento en los valores de pH (Agyirifo et al., 2019; Smid & Kleerebezem, 2014). Finalmente, las BAA también realizan un papel fundamental en la oxidación de ácidos orgánicos, por lo que es crucial la actividad de aquellas especies que utilizan el ácido láctico como fuente de carbono y llevan a cabo una sobre oxidación del ácido acético que producen (Camu et al., 2007; De Vuyst & Weckx, 2016).

Bajo este contexto, se han realizado varias investigaciones con el objetivo de seleccionar los mejores microorganismos para el desarrollo de cultivos iniciadores que incrementen la calidad de las semillas de cacao y permitan controlar el proceso de fermentación (Crafack et al., 2013; Sandhya et al., 2016). Al respecto, Visintin et al., (2017) describieron que la adición de *Saccharomyces cerevisiae* y *Torulaspora delbrueckii*, influyó positivamente sobre el perfil de compuestos volátiles y la percepción sensorial de las semillas de cacao fermentadas. De igual forma, Igor et al., (2017) reportaron que un cultivo iniciador compuesto por *S. cerevisiae* UFLA CCMA 0200, *Lactobacillus plantarum* CCMA 0238 y *Acetobacter pasteurianus* CCMA 024, fue clave para facilitar la formación de compuestos importantes como el 2,3-butanodiol y la 2,3-dimetilpirazina. Asimismo, Viesser et al., (2021) mencionaron que el inóculo de *Pichia fermentans* YC5.2 y *Lactobacillus plantarum* LPBF35 al inicio de la fermentación, facilita la formación de 2-metil-1-butanol, acetato de isoamilo y acetato de etilo, compuestos importantes en el aroma del chocolate.

Cabe destacar que varios de estos estudios se han desarrollado en África (Ghana, Camerún, Nigeria y Costa de Marfil), Asia (Malasia, Filipinas, Indonesia), Sudamérica (Brasil, Bolivia y Ecuador), Norteamérica (México), América Central (Cuba y Honduras) y Oceanía (Australia) (Figuerola-Hernández et al., 2019);

sin embargo, en Colombia no se tienen muchos estudios relacionados con el desarrollo de cultivos iniciadores y no se han tomado suficientes acciones estratégicas para desarrollar metodologías que permitan fortalecer el sector productivo e incrementar la calidad del cacao (Escobar et al., 2020). En el departamento de Nariño, es frecuente que los procesos de fermentación de cacao no cuenten con protocolos estandarizados y se lleven a cabo en cajones de madera o sacos expuestos al ambiente sin ningún tipo de control. Específicamente en la región andina en el municipio de Los Andes, Sotomayor, aún se siguen realizando estas prácticas y no se comprende cómo los grupos microbianos determinan la calidad de las semillas. En este sentido, la selección de microorganismos silvestres para desarrollar un cultivo iniciador que incida en el perfil de compuestos volátiles y no volátiles de las semillas fermentadas, se plantea como un importante objeto de investigación para incrementar la calidad del cacao producido en esta zona. Todo esto bajo el panorama de que las comunidades microbianas asociadas a la fermentación cambian en composición y abundancia de un ecosistema a otro, y facilitan la obtención de productos derivados de cacao con propiedades organolépticas distintivas para una región determinada (Figuerola-Hernández et al., 2019; Viesser et al., 2021).

En atención a los anteriores argumentos se plantea la siguiente pregunta de investigación:

¿Cómo influye un cultivo iniciador de microorganismos silvestres en el perfil de compuestos volátiles y no volátiles de las semillas fermentadas de *Theobroma cacao* L. procedente del Municipio de Los Andes, Sotomayor, Nariño?

3. Justificación

La producción y el comercio mundial de cacao ha tenido gran auge en los últimos años, registrando una producción aproximada de 4 millones de toneladas al año y representando un importante sector agroindustrial del que depende el sustento de 40 a 50 millones de personas (Afoakwa, 2014; Voora et al., 2019). Entre los principales países productores, Costa de Marfil, Ghana y Nigeria, encabezan la lista del mercado abarcando 60% de la producción (Gavrilova, 2021). En América latina, Colombia aporta 1.3% de la producción, siendo el cuarto país después de Brasil, Ecuador y Perú (Fedecacao, 2020). Además, según los datos de la Federación Nacional de Cacaoteros (Fedecacao), Colombia alcanzó una producción de 69.040 toneladas en el 2021, lo que representa un aumento del 8.9% con respecto a la producción del 2020 (Fedecacao, 2022).

A nivel nacional, el departamento con mayor producción de cacao es Santander (41%) seguido de Antioquia (9 %), Arauca y Huila (8 % cada uno), Tolima (7 %) y Nariño (5%) (Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural., 2021). Cabe resaltar que parte de estas áreas anteriormente enfrentaron problemas de orden público (Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural., 2018), por lo que el cambio de cultivos ilícitos con el apoyo del Ministerio de Agricultura y Fedecacao, logró renovar 80.000 hectáreas para el cultivo de cacao que representan la fuente de ingresos para más de 38.000 familias (Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural., 2021; Procolombia, 2020). Si bien estas prácticas incrementaron la producción de cacao en el país, el valor económico tomó el sentido contrario, ya que después de haber alcanzado un valor superior a los 9.000 COP por kilogramo en el 2015, para el 2021 los precios nacionales no superaron los 8.359 COP, incluso se encuentran registros en donde el precio disminuyó hasta los 6.886 COP (MinAgricultura, 2022).

Esta información pone en evidencia que, aunque la producción de cacao tiende a aumentar, el frecuente cambio del valor económico es un aspecto que merece una atención importante (Fedecacao, 2020); más aún, cuando en la cadena mundial del valor del cacao es un hecho que dependiendo de la calidad y características organolépticas del producto, el precio se establece de manera diferencial (Parra et al., 2021). Bajo este panorama, los pequeños productores se ubican como el gremio más afectado, ya que al realizar los tratamientos post cosecha sin ningún tipo de control sobre la calidad de las semillas dificulta que el producto obtenido sea catalogado como especial (cacao fino en sabor y aroma) (García-Cáceres et al., 2014).

A pesar de esto, el cacao colombiano ha sobresalido por su calidad en competencias mundiales, tal como el caso del producto derivado de clones de cacao provenientes de Santander y Antioquia, el cual fue ubicado en la categoría bronce en los reconocidos premios otorgados por el programa *Cocoa of Excellence* en la

edición 2021(Biodiversity International, 2021). Para Nariño, gracias al trabajo de la Alianza Exportadora de Tumaco, el producto de esta región fue catalogado como el mejor cacao de origen en la edición 2015 de esta misma competición (Laliberte, 2017). No obstante, en una zona potencial como el municipio de los Andes, Sotomayor, en donde parte de su economía se basa en el cultivo y comercio de cacao (Delgado, 2020), no hay un reconocimiento de la calidad del cacao; además, es posible que el producto cuente con problemas como: ausencia de notas de sabor y aroma (fermentación incompleta), y presencia de un exceso de acidez y sabores desagradables (sobre fermentación). Resultados que derivan de una fermentación artesanal y llevan a la producción de semillas con un bajo valor comercial (Dulce et al., 2021).

De esta manera, una estrategia para mejorar la calidad del cacao de los Andes, Sotomayor, se sustenta en el desarrollo de un cultivo iniciador que permita optimizar el proceso de fermentación y facilite la obtención de semillas de cacao con un perfil de compuestos volátiles y no volátiles que atribuyan características sensoriales deseables (Batista et al., 2016; Castro-Alayo et al., 2019; Lima et al., 2021). Por lo tanto, el estudio de los microorganismos silvestres aislados de fermentaciones bajo condiciones artesanales de esta zona, es indispensable para la selección de microorganismos que cuenten con la capacidad de influir positivamente sobre el perfil sensorial de las semillas fermentadas. Además, esta metodología podría aumentar la probabilidad de acceso de los agricultores regionales hacia mercados con estándares de calidad elevados.

4. Marco teórico

4.1 *Theobroma cacao* L.

Theobroma cacao L., hace parte de la familia Malvaceae y es un árbol perenne de 8 a 15 m de altura, que bajo condiciones agrícolas solo alcanza los 3 m debido a los procesos de poda para un mejor control fitosanitario. Aunque todavía existe cierta controversia sobre el origen y la domesticación de las poblaciones silvestres de cacao, Vanderschueren et al., (2019) sugieren que las plantas se originaron en América Central y del Sur. De tal manera, se han propuesto las selvas bajas neotropicales como su hábitat natural y su cultivo se extendió a diferentes áreas húmedas a lo largo del trópico debido a su importancia en la economía mundial (Fowler, 2009; Wood & Lass, 2001).

El fruto es una cápsula de forma ovalada que mide entre 12 y 30 cm, contiene de 30 a 40 semillas y alberga una pulpa mucilaginosa que comprende aproximadamente el 40% del peso fresco de cada semilla (Schwan & Wheals, 2004). El mucílago se caracteriza por un contenido rico en azúcares como glucosa, fructosa y sacarosa que representan aproximadamente entre 9 a 13% (p/p), y un pH de 3.0 a 3.5, conferido por la presencia de ácidos orgánicos, generalmente cítrico y oxálico (Ho et al., 2015). También se reporta un contenido de proteína en el rango de 0.4 a 0.6% (p/p), pectina esterificada entre 1 a 1.5% (p/p) y otros compuestos como aminoácidos libres, vitaminas y minerales (Kongor et al., 2016).

La semilla de cacao se compone de dos partes principales, el embrión y la testa (cubierta de la semilla o cáscara) (Thompson et al., 2007). El embrión presenta dos cotiledones plegados conectados por un pequeño eje embrionario y estos se estructuran de dos tipos de células: células de parénquima o de almacenamiento, que contienen glóbulos de grasa, proteínas y gránulos de almidón (Biehl & Ziegler, 2003); y células pigmentadas más grandes, que contienen polifenoles y alcaloides (Kongor et al., 2016). De esta manera, la pulpa y las semillas ofrecen los sustratos necesarios para el crecimiento de diferentes microorganismos presentes en el ambiente, de los cuales, algunos van a ser fundamentales en el proceso de fermentación (Lima et al., 2011).

4.2 Calidad de las semillas de cacao

El comercio mundial de cacao y los criterios para evaluar las semillas aumentan cada año, por lo que es importante las investigaciones que permitan cumplir con estos requerimientos de calidad, así como con la legislación internacional de importación y exportación que tiene por objetivo la seguridad alimentaria (Laliberte, 2017). Entre los indicadores que se utilizan para determinar la calidad de las semillas de cacao, se incluyen la cantidad de carbohidratos simples, proteínas, lípidos, polifenoles y alcaloides (Loureiro et

al., 2017). Sin embargo, el perfil cualitativo y cuantitativo de los compuestos volátiles y no volátiles, se ha planteado entre los indicadores más importantes debido a la influencia directa en las características de sabor y aroma (Afoakwa et al., 2008; Loureiro et al., 2017; Rodríguez-Campos et al., 2012). Siendo estas propiedades aspectos fundamentales para la demanda de cacao de alta calidad (Kongor et al., 2016).

Cabe destacar que la presencia y concentración de todos estos compuestos en las semillas puede variar según el genotipo de la planta, las condiciones ambientales de la zona geográfica, las prácticas agrícolas y los tratamientos post cosecha (Kongor et al., 2016; Santander-Muñoz et al., 2020).

4.3 Compuestos no volátiles

La deficiencia de carbohidratos reductores como fructosa y glucosa en las semillas de cacao puede representar una baja calidad de las mismas, debido a que esto es un factor limitante para el crecimiento de microorganismos con funciones importantes durante el proceso de fermentación (Kongor et al., 2016). De igual forma, es importante destacar que el exceso de residuos de carbohidratos simples en las semillas fermentadas reduce su calidad, por lo que la proporción de glucosa y fructosa debe mantener una relación 2 a 1 respectivamente (Lima et al., 2011).

Los lípidos se destacan como componentes importantes de las semillas porque determinan las características físicas y la estabilidad de los productos obtenidos al final de los procesos postcosecha (Wood & Lass, 2001). Se informa que un contenido adecuado de lípidos en las semillas de cacao fermentadas y secas puede oscilar entre 48 a 52% y 50 a 55% respectivamente (Loureiro et al., 2017). Acerca del contenido proteico, se presentan cuatro fracciones predominantes que constituyen 95% (p/p) del total de proteínas en la semilla, y estas son albúminas (solubles en agua), globulinas (solubles en disoluciones salinas), prolaminas (solubles en alcohol) y glutelinas (solubles en ácidos diluidos) (Kongor et al., 2016). Se considera conveniente la presencia de globulinas del tipo vicilina, las cuales se degradan durante la fermentación (88-90% del contenido inicial) en compuestos fundamentales para desarrollar las reacciones de Maillard durante el secado y tostado (Crafack et al., 2014).

Por otra parte, metilxantinas como la teobromina y cafeína, representan más del 99% de los alcaloides presentes en las semillas y su relación según las variedades de cacao oscilan entre 15-10 (Forastero), 10-5 (Trinitario) y 2-1 (Criollo) (Loureiro et al., 2017). Estos compuestos pueden aparecer con un valor promedio de 1.5% (p/p) en las semillas frescas, sin embargo, concentraciones superiores disminuyen la calidad de las semillas al conferir un exceso de amargura en el sabor (Ramli et al., 2001). Con respecto a los polifenoles, la cantidad total puede variar entre 5 - 6 % (p/p) y se distinguen grupos como catequinas (38%),

antocianinas (4%) y proantocianidinas (58%) (Bordiga et al., 2015; Wollgast & Anklam, 2000). Un contenido igual o superior al 10% (p/p) se considera como un indicador de mala calidad, ya que conduce a la obtención de cacao con un sabor astringente (Oracz et al., 2015).

Finalmente, el exceso de ácidos orgánicos se considera uno de los factores más determinantes, debido a que concentraciones superiores a 5.5 g kg^{-1} para los diferentes ácidos: láctico, cítrico, succínico, oxálico y la fracción no volátil del ácido acético; reduce significativamente la calidad sensorial de las semillas fermentadas. Estas características se relacionan con valores de pH inferiores a 4.5, que establecen un potencial de sabor reducido y verifican la presencia de ácidos orgánicos no deseables (Loureiro et al., 2017). Es importante tener en cuenta que, aunque generalmente se monitorean las concentraciones de ácido láctico, acético y cítrico, incluir el análisis sobre el consumo y producción del ácido oxálico y succínico es necesario para determinar si el proceso de fermentación se realizó de manera adecuada y establecer el equilibrio sensorial deseable en las semillas (Badrie et al., 2015; Kim et al., 2009; Van Der Meulen et al., 2006). De esta manera, se hace fundamental que las concentraciones de los diferentes ácidos orgánicos en las semillas fermentadas se encuentren dentro de los rangos establecidos, ya que de eso depende gran parte de su aceptación en el mercado (Afoakwa et al., 2008).

4.4 Compuestos volátiles

Los sabores y aromas característicos del cacao se deben a una fracción volátil conformada por una mezcla de cientos de compuestos volátiles, por lo que su presencia o ausencia influye significativamente en la calidad de las semillas (Castro-Alayo et al., 2019; Ziegler, 2009). Se reporta que existen más de 600 compuestos organizados en diferentes grupos químicos incluidos los aldehídos, pirazinas, ácidos, alcoholes, ésteres, cetonas, furanos, pirroles, fenoles, terpenos, entre otros (Tabla 1) (Counet et al., 2002; Moreira et al., 2018). Generalmente, es deseable la presencia de ciertos aldehídos, cetonas, alcoholes, ésteres y pirazinas, que en conjunto atribuyen características agradables de chocolate con notas equilibradas de malta, caramelo, frutales, florales y herbales. Así, mientras que la mayoría de los ésteres confieren un atributo afrutado/floral, las pirazinas pueden aportar notas de chocolate/tostado (Melo-Ramos et al., 2016; Owusu, 2010). Además, se reporta que alcoholes como el 3-metil-1-butanol, 2,3-butanodiol y 2-feniletanol son compuestos deseables para productos de cacao de alta calidad (Schwan & Wheals, 2004). Por el contrario, la presencia de la mayoría de ácidos disminuye significativamente la calidad del cacao, esto debido a que aportan propiedades sensoriales no deseables y son las causantes del rechazo de las semillas (Ho et al., 2018).

Tabla 1. Compuestos volátiles identificados durante el proceso de fermentación y secado de las semillas de cacao. Tomado y modificado de: Rodriguez-Campos et al., (2011) y Utrilla et al., (2019)

Grupo	Compuesto	Notas de sabor y aroma
Aldehídos	2-metil-1-propanal	Malta, chocolate
	Pentanal	Almendra, malta, acre
	Fenil acetaldehído	Miel, floral, dulce
	2-Metilpropanal	Malta, chocolate
	2-Metilbutanal	Malta, chocolate
	3-Metilbutanal	Malta, chocolate, cacao
	Hexanal	Herbal, herbáceo
	(E)-2-Metil-2-butanal	Frutal, herbal
	Octanal	Graso
	Nonanal	Graso
	3-(Methional)-propanal	Sulfuroso, herbáceo
	(E, E)-2,4-Heptadienal	Nuez, graso
	Benzaldehído	Caramelo, almendra
	5-Metil-2- furancarboxaldehído	Caramelo, café
	2-Metil-benzaldehído	Cereza
	Benceno acetaldehído	Herbal
	Hexadecanal	Miel, floral
	3-Etil-benzaldehído	
	4-Etil-benzaldehído	Frutal
	2-Phenilpropanal	Herbal
	3-Phenil-2-propanal	Picante
	(E)-Cinnamalaldehído	Canela
	2-fenilbut-2-enal	Floral, miel, cacao
	5-Metil-2-fenil-2- hexanal	Cacao
Cetonas	3-hidroxibutanona	Mantequilla, crema
	1-feniletanona	Floral, almendra, dulce
	Fenilmetil cetona	
	2-pentanona	Frutal, dulce
	2,3-butanodiona	Mantequilla
	(E)-3-Pentan-2-ona	Frutal, pescado, alcohol
	2-Heptanona	Pera, uva, brandy, floral
	2,4-Pentanodiona	Nata, mantequilla, queso azul
	2-Octanona	Mantequilla, crema
	Acetoína	Mantequilla, leche agria, caramelo
	2-Nonanona	Frutal, rancio
	2-Undecanona	Frutal
	Butirolactona	Dulce, aromático, crema
	Acetofenona	Floral, almendra, picante, dulce

Grupo	Compuesto	Notas de sabor y aroma
Alcoholes	3-Metilacetofenona	
	2-Acetofenol	Fenol
	4-fenil-3-butan-2-ona	Dulce, picante, canela, frutal
	1-(4-Etilfenil)- etanona	Dulce, anís, vainilla
	Benzofenona	Bálsamo, rosa, geranio
	1-propanol	Acre, caramelo
	2-metil-1-propanol	Vino
	3-metil-2-butanol	
	2-pentanol	Dulce
	3-metil-1-butanol	Malta, amargo, chocolate
	2,3-Butanodiol	Frutal, crema
	1,3-Butanodiol	
	Fenilmetanol	Dulce, floral
	2-Feniletanol	Miel, floral, caramelo
	Alcohol isopropílico	Madera
	Etanol	Alcohol
	2-Methyl-3-buten-2-ol	Herbal
	Isobutanol	Vino, amargo
	2-Pentanol	Herbal
	Alcohol isoamílico	Malta, whisky, tostado
Ésteres	1-Pentanol	Dulce
	2-Heptanol	Dulce, cítrico
	3-Etil-2-pentanol	
	1-Hexanol	Frutal, herbal
	3-Hexen-1-ol	Herbáceo, herbal
	2-Nonanol	Graso, herbáceo
	1-Octanol	Nuez, dulce, floral
	1-feniletanol	Herbal, frutal
	Alcohol bencílico	Dulce, floral
	Alcohol feniletílico	Miel, rosa, caramelo
	Guaiacol	Ahumado, picante
	Benceno propanol	Picante, canela, frutal, floral
	Metil acetato	
	Acetato de etilo	Frutal
	2-metilpropil etanoato	Frutal
	3-metil-2-butil acetato	
	3-metil-1-butil acetato	
	Lactato de etilo	Frutal
	Etil fenilacetato	Frutal, miel
	Laurato de etilo	Frutal, floral

Grupo	Compuesto	Notas de sabor y aroma
	Palminato de etilo	Cera
	Etil acetato	Piña
	Isobutil acetato	Manzana, banana
	Metil isovalerato	Frutal
	Etil pentanoato	Manzana
	2-Pentil acetato	Banana
	Isoamil acetato	Banana
	Etil hexanoato	Manzana
	Isoamil isovalerato	Frutal
	Etil heptanoato	Frutal
	Isoamil lactato	Frutal, nuez, crema
	Hexil butirato	Manzana
	Etil octanoato	Piña, floral,
	Etil decanoato	Pera, uva, brandy
	Metil benzoato	Herbáceo, dulce
	Etil benzoato	Manzanilla, floral, apio, frutal
	Benzil acetato	Floral, jazmín
	Metil fenilacetato	Miel, jazmín
	2-fenetil acetato	Frutal, floral, dulce, tabaco
	Isobutil benzoato	Balsámico
	Butil butirato	Frutal
	Etil 3- fenilpropionato	Floral
	Etil miristato	Cera, jabón
	Etil cinnamato	Miel, canela
	Etil palmitato	Cera, herbal
Ácidos	Ácido acético	Agridulce, astringente, vinagre
	Ácido propiónico	Acre, astringente, soja, rancio
	Ácido isobutírico	Astringente, rancio, queso
	Ácido butanoico	Astringente
	Ácido isovalérico	Astringente, queso azul
	Ácido hexanoico	Astringente, acre, amargo
	Ácido octanoico	Graso
	Ácido nonanoico	Graso
	Ácido dodecanoico	Metal
	Ácido propanodioico	Acre
	Ácido heptanoico	Rancio, agrio
	Ácido benzoico	Urea

Grupo	Compuesto	Notas de sabor y aroma
Pirazinas	Tetrametilpirazina	Tostado, chocolate, café
	Metilpirazina	Nuez, chocolate, tostado
	2,5-dimetilpirazina	Chocolate, nuez
	2,6-dimetilpirazina	Nuez, herbal
	2,3-dimetilpirazina	Caramelo, cacao
	Trimetilpirazina	Cacao, nuez, maní
Furanos	2-etil-5-metil-furano	Tostado
	2-pentil-furano	Mantequilla, frutal
	Furfural	Almendra, dulce
	2-etenil-benzofurano	
Hidrocarburos	α -Pino	Pino
	β -Mirceno	Balsámico, especias
	D-Limoneno	Cítrico
	Bifenil	Geranio, rosa, picante

4.5 Factores que influyen en la calidad del cacao

Varios factores como el genotipo de la planta, la ubicación geográfica del cultivo, las prácticas agrícolas y los tratamientos postcosecha como el pre acondicionamiento de la pulpa, la fermentación, el secado y el tostado influyen significativamente en los atributos organolépticos que determinan la calidad del cacao (Afoakwa, 2016; Owusu et al., 2012). Entre estos procesos, la fermentación se considera como el factor más importante, ya que durante esta etapa se generan precursores de sabor y aroma, se forma una fracción de los compuestos volátiles, se determina la concentración de ácidos orgánicos no volátiles, se desarrolla el color y hay una reducción de la amargura y astringencia de las semillas (Escobar et al., 2021; Ganeswari et al., 2015).

4.5.1 Efecto del genotipo y ubicación geográfica

El genotipo de la planta influye en el tipo y cantidad de proteínas de almacenamiento de las semillas, aminoácidos, carbohidratos, polifenoles y alcaloides que se degradan durante la fermentación y el secado para formar precursores de sabor y aroma (Kongor et al., 2016). Lo anterior, sumado con los factores bióticos y abióticos de la ubicación geográfica de la planta, permite que existan diferencias en el perfil del sabor (Tabla 2). Generalmente se consideran tres variedades de cacao: Forastero, Criollo y Trinitario, que muestran diferencias en la apariencia de los frutos, composición química de las semillas, características del sabor y la resistencia a plagas y enfermedades (Beckett, 2008; Motamayor et al., 2008)

Tabla 2. Características del sabor de semillas de cacao provenientes de diferentes regiones geográficas. Tomado y modificado de Kongor et al., (2016)

Origen	Tipo de cacao	Perfil de sabor
Costa de Marfil	Forastero	Bajo amargor, baja acidez, frutal, nuez
Ghana	Híbridos Forastero	Chocolate suave
Nigeria	Híbridos Forastero	Notas suaves de cacao
Santo Tomé y Príncipe	Forastero	Notas suaves de cacao, amargo, picante, frutal, terroso
Madagascar	Criollo	Notas de vino, cítricas
Venezuela	Criollo	Chocolate suave, ligeramente amargo, notas frutales distintivas (ciruela y cereza)
Brasil	Forastero	Amargo, ácido, astringente, frutal
Colombia	Trinitario y criollo	Frutal, amargo, cacao
Perú	Forastero	Ligeramente amargo, frutal
Ecuador	Forastero (Nacional)	Chocolate suave, notas floral, frutal, herbáceas, terrosas
México (Tabasco)	Híbridos Criollo/Forastero	Chocolate suave, ácido, levemente frutal
Panamá	Forastero	Chocolate suave, ácido, frutos secos
Jamaica	Forastero	frutal
República Dominicana	Híbridos Criollo/Forastero	Leves notas de cacao, amargo
República Dominicana	Híbridos Criollo/Forastero	Vino, terroso, puede tener notas de tabaco
Costa Rica	Forastero	Frutal, cacao
Trinidad & Tobago	Trinitario	Notas intensas de cacao, nuez y vino
Granada	Trinitario	Chocolate, frutal, floral, herbáceo, amaderado
Indonesia	Híbridos Criollo/Forastero	Chocolate bajo, ácido, afrutado
Malasia	Híbridos Forastero	Cacao bajo a medio, acidez media a alta, astringente, fenólico
Java	Híbridos Criollo/Forastero	Notas leves de cacao, ácido
Papúa Nueva Guinea	Híbridos Criollo/Forastero	Nivel de acidez variable, floral, nuez

4.5.2 Pre acondicionamiento de la pulpa

La pulpa es el tejido mucilaginoso que recubre las semillas de cacao, su composición juega un papel importante en la fermentación del cacao, puesto que es el sustrato que utilizan los microorganismos para su

crecimiento. Es por esto, que el pre acondicionamiento de la pulpa se realiza para cambiar sus propiedades y optimizar el rendimiento de los procesos posteriores (Afoakwa et al., 2011). La pulpa de cacao puede pre acondicionarse ya sea dentro del fruto (almacenamiento de las cápsulas antes de que la pulpa adherida a las semillas entre en contacto con el ambiente para el proceso de fermentación) o fuera de las cápsulas (retirando la pulpa de forma mecánica o enzimática) (Afoakwa et al., 2013).

Afoakwa et al., (2012) determinó que el almacenamiento de los frutos influye en la composición de la pulpa, ya que es probable que se mantengan altas concentraciones de azúcares y esto representa la disponibilidad de sustrato para el desarrollo microbiano. De tal forma, cambios en la pulpa, como la alteración del contenido de humedad, el contenido de azúcar, el volumen de pulpa por semilla y el pH, pueden afectar el metabolismo de los diferentes grupos microbianos como LEV, BAL y BAA (Afoakwa, 2016). Por otro lado, se demostró que la eliminación de porciones de pulpa en las semillas de cacao o la reducción del contenido de azúcar fermentable contribuye a una menor concentración de ácidos y cambios en el contenido de polifenoles durante la fermentación, lo que puede tener efectos en las características sensoriales de las semillas de cacao (Afoakwa, 2014).

4.5.3 Fermentación

Uno de los factores cruciales para la obtención de semillas de cacao con calidad aceptable en el mercado es el proceso de fermentación, que cuando se realiza correctamente establece las condiciones ideales para el desarrollo de las propiedades sensoriales que caracterizan el producto obtenido (Afoakwa et al., 2008). Dentro de los procesos biotecnológicos, la fermentación del cacao se ubica dentro de la categoría de fermentación en estado sólido. De esta forma, se considera que el tipo de recipiente empleado para colocar las semillas (generalmente cajas de madera), es un ejemplo de biorreactor estático, y como tal, esto implica cierta dificultad en la aireación y distribución homogénea de nutrientes (Chagas-Junior et al., 2021). En la etapa de fermentación intervienen diferentes microorganismos que cumplen con un papel determinante en las reacciones bioquímicas encargadas de la muerte del embrión de la semilla, el metabolismo de los sustratos disponibles y la formación de compuestos volátiles y no volátiles específicos (De Vuyst & Leroy, 2020).

Los tres grupos de microorganismos más reportados durante la fermentación de cacao son las LEV, BAL y BAA, y más recientemente, se describió la participación de hongos con la actividad de hidrolasas (de Araújo et al., 2019; Pereira et al., 2012, 2013). Cada grupo se desarrolla de acuerdo con las condiciones del proceso, es por esto que una fase inicial de anaerobiosis permite el crecimiento de LEV que producen etanol a partir de los azúcares presentes en la pulpa (Lefebvre et al., 2012). Simultáneamente, las BAL también consumen

parte de estos carbohidratos y el ácido cítrico para la producción de ácido láctico (Thompson et al., 2007). En secuencia, el aumento de la concentración de oxígeno y acidez estimula el crecimiento de las BAA, que convierten parte del etanol en ácido acético en una reacción exotérmica que facilita un incremento notable de la temperatura (Ho et al., 2018). Adicionalmente, con el aumento de la permeabilidad de las semillas como resultado de la actividad pectinolítica de algunas LEV, es posible la difusión del etanol y el ácido acético hacia el interior de las semillas que causan la muerte del embrión y se inician las reacciones bioquímicas que llevan al desarrollo del perfil sensorial de las semillas fermentadas (De Vuyst & Leroy, 2020).

Como se mencionó anteriormente, es importante señalar que durante la fermentación se incluye el metabolismo de otros compuestos volátiles y no volátiles, lo que, a su vez, depende de las funciones bioquímicas que desempeñan las especies de microorganismos presentes a lo largo del proceso. De hecho, varios estudios describen que la diversidad de microorganismos cambia de acuerdo a las condiciones ambientales y técnicas empleadas en la fermentación del cacao; por lo tanto, la ecología microbiana y la dinámica metabólica durante el proceso puede ser característica de la región en donde se realice la fermentación (Agyirifo et al., 2019).

4.5.4 Secado

Durante el secado la transferencia de calor a las semillas hace que el contenido de agua se evapore hasta alcanzar valores de humedad cercanos al 7%, esto inhibe el crecimiento de moho en el almacenamiento y permite que las reacciones químicas responsables del desarrollo del sabor y aroma continúen (Ziegler, 2009). En tal sentido, este procedimiento inicia importantes reacciones de oxidación catalizadas por diferentes enzimas que dan lugar a la formación de más compuestos volátiles, pérdida de la integridad de la membrana y desarrollo del color marrón característico de las semillas (Ramos-Escudero et al., 2021). De igual forma, se evidencia una reducción de los niveles de amargura, astringencia y ácidos volátiles con notas no deseables en el perfil sensorial de las semillas (Afoakwa, 2016).

Cuando el proceso se desarrolla en un periodo de tiempo corto y se utiliza una temperatura inicial elevada, la testa se endurece y se adhiere al cotiledón, lo que limita el transporte de oxígeno al interior de la semilla (Ho et al., 2014). En consecuencia, se reduce significativamente la actividad de las enzimas polifenol oxidasa, evitando la transformación de antocianinas y catequinas en quinonas, y dando lugar a semillas violetas con mayor astringencia y amargor. Por el contrario, si las condiciones de secado son adecuadas, las quinonas producidas se condensan con aminoácidos libres y grupos sulfhidrilo para la formación del color marrón (Lasini & Engineering, 2014). Aparte de esto, es posible la migración hacia el exterior de las

semillas de algunos ácidos volátiles que aportan características perjudiciales sobre las propiedades del sabor (Tuentner et al., 2020).

Entre los métodos empleados para realizar este proceso, el secado al sol se ha considerado adecuado para obtener buenas características sensoriales de las semillas y, a menudo, lo llevan a cabo los pequeños productores (Hii et al., 2006). Sin embargo, este sistema de secado tiene desventajas porque depende de las condiciones ambientales las cuales dificultan el control de este proceso y conlleva a una producción de cacao con calidad heterogénea (Dzelagha et al., 2020). Adicionalmente, se han estudiado métodos alternativos como el secado artificial por convección forzada con aire caliente, que se suele utilizar en centros productivos con mayores capacidades técnicas (Hii et al., 2009; Páramo et al., 2010). Bajo este mecanismo se han evaluado diferentes temperaturas y las más utilizadas varían entre 40 °C y 60 °C en condiciones de laboratorio (Rodríguez-Campos et al., 2012; Schwan & Wheals, 2004).

4.5.5 Tostado

El tostado es una operación importante dentro del procesamiento del cacao ya que esta fase es definitiva en la formación del color, aroma, sabor y textura deseada (Krysiak, 2011; Wood & Lass, 2001; Zzaman & Yang, 2013). Cabe destacar que los compuestos volátiles, aminoácidos libres, péptidos de cadena corta y azúcares reductores formados durante el proceso de fermentación y secado, se someten a la reacción de Maillard y la degradación de Strecker durante el tostado para obtener las características sensoriales finales (De Brito et al., 2001; Hu et al., 2016). Como ejemplo de las reacciones que pueden desarrollarse, en el proceso de Maillard los derivados carbonilo interactúan con aminoácidos libres para dar paso a la degradación de Strecker, esto provoca que a partir de cada aminoácido se produzca un aldehído con una característica específica de sabor y aroma (Afoakwa et al., 2008).

Al igual que en el secado, las condiciones de temperatura y tiempo empleado durante el tostado afectan las propiedades químicas y físicas de las semillas y, en consecuencia, la calidad de los productos derivados (Krysiak & Motyl-Patelska, 2006; Youssef & Abo-Bakr, 2019). La alta temperatura reduce específicamente los ácidos volátiles con bajo punto de ebullición, como el ácido acético (Marseglia et al., 2020). Sin embargo, ácidos como el oxálico, cítrico, succínico y láctico, permanecen prácticamente sin cambios al finalizar el proceso (Afoakwa et al., 2008; Ho et al., 2015). Las condiciones de este proceso generalmente varían de 15 a 60 min con temperaturas de 120 a 160 °C (Krysiak & Motyl-Patelska, 2006).

Entre las técnicas empleadas, en el método tradicional las semillas se ubican en bandejas planas en hornos de convección estándar o se puede utilizar un túnel de aire caliente con rotación (Zyzelewicz et al., 2014). Adicionalmente, se ha propuesto la técnica de tostado por infrarrojos como una alternativa prometedora

debido a los menores costos de energía, la alta eficiencia de calentamiento, el tamaño compacto del equipo y el alto coeficiente de difusión de calor (Bhinder et al., 2019). El tostado convencional con aire caliente transfiere calor a la superficie de las semillas por convección, que luego viaja a la biomasa por conducción térmica (Mazaheri et al., 2019). Por el contrario, los calentadores de infrarrojos emiten ondas electromagnéticas que penetran y transfieren energía térmica por todo el volumen del material (Bhinder et al., 2019).

4.6 Microorganismos fermentadores

4.6.1 Levaduras

Los roles funcionales de las LEV en la fermentación del cacao están relacionados generalmente con el consumo de azúcares presentes en el mucílago y la producción de etanol, dióxido de carbono y una amplia gama de metabolitos secundarios (Loviso & Libkind, 2018). De tal forma, en el inicio del proceso, las LEV utilizan la glucosa disponible a través de la vía glucolítica para la producción de etanol y dióxido de carbono que mantienen las condiciones de la fase anaeróbica, lo cual es clave para el crecimiento simultáneo de las BAL (Camu et al., 2007). La producción de etanol es crucial para el desarrollo de otros microorganismos, siendo uno de los principales sustratos de las BAA, al igual que es uno de los compuestos que migra hacia los tejidos internos de la semilla para contribuir con la muerte del embrión (Sandhya et al., 2016). Adicionalmente, se planteó que la muerte celular de las LEV puede proporcionar micronutrientes, como vitaminas y aminoácidos, para favorecer el crecimiento de otros microorganismos (De Vuyst & Leroy, 2020).

Así mismo, las LEV tienen la capacidad de consumir sacarosa y se considera que las invertasas juegan un papel importante en su conversión (Díaz-Muñoz & De Vuyst, 2021). Aunque existe una preferencia por la glucosa y degradar la sacarosa puede ser menos eficiente en términos de producción de energía, esta alternativa es una estrategia para producir altas concentraciones de etanol y, así, establecer condiciones de estrés para otros microorganismos en la matriz de fermentación (Samagaci et al., 2014). De hecho, es probable encontrar especies de *Hanseniaspora* en la primera fase de fermentación, pero luego pueden decrecer a favor de las especies de *Saccharomyces* o *Pichia* que son tolerantes a los niveles de etanol una vez alcanzan su punto máximo (Fernández-Maura et al., 2016; Koné et al., 2016).

Con respecto al metabolismo de ácidos orgánicos, bajo condiciones *in vitro* se describió que algunas LEV como *Pichia kudriavzevii*, *Pichia kluyveri* y *Candida tropicalis* pueden asimilar ácido cítrico, compuesto que típicamente está relacionado con el metabolismo de BAL (Samagaci et al., 2016). Para ello, utilizan el ciclo del ácido tricarboxílico o del glioxilato bajo condiciones aeróbicas (Casal et al., 2008). Sin embargo,

es posible que cierto porcentaje de LEV no consuman citrato durante la fermentación del cacao, especialmente cuando los carbohidratos están ampliamente disponibles y las condiciones aeróbicas no se cumplen, o simplemente porque no son lo suficientemente competitivas en comparación con la capacidad metabólica de las BAL (De Vuyst & Leroy, 2020). Cabe señalar que la producción de ácidos orgánicos también está relacionada con estos microorganismos, incluido el ácido acético y el ácido succínico a través del metabolismo del piruvato y la actividad del ciclo del ácido tricarboxílico respectivamente (Dzialo et al., 2017; Xi et al., 2021).

Por otra parte, se reportó que varias especies de LEV tienen actividad pectinolítica con una función importante en la degradación y solubilización del mucílago (Haile & Kang, 2019). Para tal efecto, se requiere de varias enzimas incluidas la poligalacturonasa, la pectina metilesterasa (PME) y la pectina liasa (PL), que con diferentes mecanismos de acción facilitan la degradación de las cadenas primarias de la pectina y disminuyen la consistencia fibrosa de la pulpa de cacao (Meersman et al., 2017). Las condiciones en las que estas enzimas trabajan varían mucho, además de la dependencia directa con la cepa de LEV que las produce (Díaz-Muñoz & De Vuyst, 2021). Entre los rangos propuestos se tienen valores de pH de 3,5 a 6,0 y temperaturas de 30 a 50 ° C, lo que refleja la probabilidad de que este proceso puede tener lugar en diferentes fases de la fermentación (Samagaci et al., 2015). De igual forma, la actividad pectinolítica permite un aumento de la porosidad de la testa, y por tanto, la penetración de aire con diferentes metabolitos al interior de las semillas para dar inicio a las reacciones bioquímicas que influyen en las propiedades químicas y físicas de las mismas (De Vuyst & Leroy, 2020).

Otro papel importante de las LEV es la producción de compuestos volátiles que influyen en las características de sabor y aroma de las semillas de cacao (Castro-Alayo et al., 2019; Cevallos-Cevallos et al., 2018; Koné et al., 2016). Debido a que las LEV utilizan diferentes rutas metabólicas para la formación de estos compuestos, es posible la obtención de una amplia variedad de alcoholes, aldehídos, cetonas, ésteres, ácidos, pirazinas, entre otros (Dzialo et al., 2017). En tal sentido, es primordial tener en cuenta que el perfil cualitativo y cuantitativo de estos metabolitos varía en función de la actividad enzimática de las especies de LEV presentes y las condiciones del proceso de fermentación (Meersman et al., 2016; Pereira et al., 2017).

4.6.2 Bacterias ácido lácticas

El papel de las BAL tiene lugar desde la fase inicial de la fermentación de cacao, ya que su desarrollo simultáneo con las LEV es posible por su preferencia para consumir fructosa y ácido cítrico disponible en el mucílago, y por su capacidad de crecer en un ambiente anaeróbico (Lefeber et al., 2010). Cabe señalar

que, superadas las condiciones iniciales de fermentación, comúnmente después de 24 a 72 h, ciertas especies de BAL cuentan con un metabolismo capaz de asimilar glucosa y/o fructosa para la producción no solo de ácido láctico, sino de una serie de compuestos más amplia (Ho et al., 2015).

Bajo este contexto, las BAL se pueden clasificar de acuerdo a dos tipos de metabolismo: homofermentativo y heterofermentativo (Papadimitriou et al., 2016). Las especies homofermentativas metabolizan los carbohidratos a través de la vía de glucólisis para producir ácido láctico. Por su parte, las especies heterofermentativas degradan los carbohidratos por medio de la vía del monofosfato de hexosa, permitiendo la producción de ácido láctico, ácido acético, dióxido de carbono, manitol y derivando en la formación de algunos compuestos volátiles como acetoina, 2,3-butanodiona, 2,3-butanodiol, entre otros (Afoakwa et al., 2008; Lahtinen et al., 2011). Se reportó que las BAL heterofermentativas pueden utilizar el ácido cítrico como una alternativa de aceptor de electrones para la producción de dichos compuestos (Moreira et al., 2013).

Es importante considerar que una fracción del ácido láctico puede difundirse hacia el interior de las semillas, y dado que no es un componente volátil, es difícil su eliminación en los procesos de secado y tostado (Lefeber et al., 2010). Por lo tanto, es fundamental la presencia de BAL heterofermentativas que al producir otros metabolitos secundarios no generen una alta concentración de acidez (Luc De Vuyst & Leroy, 2020). Sumado a esto, se reportó que especies heterofermentativas como *Lactobacillus plantarum* y *Lactobacillus fermentum* son tolerantes a las condiciones más altas de etanol y temperatura, siendo un mecanismo que asegura en cierta medida su presencia a lo largo de la fermentación (Lefeber et al., 2010). También hay que mencionar que algunas BAL producen sustancias con propiedades antibacterianas y antimicóticas, de esta manera, se resalta su actividad frente a la inhibición de bacterias patógenas y hongos que perjudican la calidad de las semillas fermentadas (Fanche et al., 2020).

4.6.3 Bacterias ácido acéticas

Las BAA pueden estar presentes desde el comienzo de la fermentación de cacao, no obstante, su potencial para crecer y utilizar los sustratos disponibles estaría limitado por las condiciones anaeróbicas en esta etapa (Wollgast & Anklam, 2000). De tal manera, su desarrollo y actividad ocurren generalmente alcanzadas las 72 a 96 h después del crecimiento de LEV y BAL, cuando incrementa la concentración de oxígeno en la masa fermentable (Lefeber et al., 2010). Esto es posible gracias a la entrada de aire facilitada por la degradación de la pulpa y por los procesos de homogeneización de las semillas que se realizan durante la fermentación (Dulce et al., 2021).

Metabólicamente, las BAA oxidan el etanol producido por las LEV en ácido acético, en una reacción bastante exotérmica lo cual permite que durante la fermentación se alcance una temperatura hasta los 50° C (Schwan & Fleet, 2014) . Así mismo, el incremento de la temperatura está favorecido por la capacidad que tienen estas bacterias para realizar una oxidación adicional del ácido acético en dióxido de carbono y agua, aspecto que facilita un ligero aumento en los valores de pH (Gerard, 2015). Por otro lado, es indispensable que el ácido acético no consumido migre hacia el interior de las semillas para asegurar la muerte del embrión. De esta manera, las funciones de las BAA son fundamentales para que el proceso de fermentación finalice y se presente el ambiente propicio en el que se desarrollan las reacciones bioquímicas que influyen en las características sensoriales de las semillas (Schwan & Fleet, 2014).

Otro rasgo importante de algunas especies de BAA, es su capacidad para utilizar el ácido láctico como fuente de carbono, lo cual denota su papel activo en la determinación del nivel de acidez en las semillas de cacao fermentadas (Adler et al., 2014; Moens et al., 2014; Pelicaen et al., 2019). También se describió que la producción de ácido acético puede influir sobre el crecimiento de otros microorganismos, por ejemplo, es probable que tenga un efecto inhibitorio sobre el desarrollo de hongos toxigénicos que perjudican la calidad de las semillas (Copetti et al., 2012).

4.7 Cultivo iniciador

La función principal de un cultivo iniciador es inducir procesos de fermentación más rápidos y predecibles mientras se controlan los aspectos sensoriales y nutricionales del producto final (Cruxen et al., 2019). Bajo este contexto, la selección de microorganismos en la industria alimentaria requiere un enfoque sistemático que permita reducir progresivamente el número de candidatos, entre los principales criterios de selección se incluyen: detección de rangos de tolerancia frente a condiciones estresantes de la fermentación, producción de metabolitos clave y evaluación de parámetros tecnológicos (Agyirifo et al., 2019; Lima et al., 2011). Al final de este procedimiento, se seleccionan las cepas que presentan el mayor número de propiedades funcionales y, al mismo tiempo, sin ningún rasgo negativo (Mendoza-Salazar et al., 2022). Por último, para fines comerciales, el cultivo iniciador debe ser apto para el cultivo a gran escala en sustratos relativamente económicos, además de ser resistente en los procesos de liofilización, almacenamiento y, finalmente, rehidratación y reactivación. Estos requisitos son necesarios sin perder las funciones específicas que cumplen a lo largo de los procesos de fermentación (Pereira et al., 2020).

Como se mencionó, en la fermentación de cacao es indispensable la participación de diferentes grupos microbianos que llevan a cabo importantes actividades metabólicas a lo largo del proceso (Colonges et al., 2022; Crafac et al., 2014). De tal forma, el desarrollo de un cultivo iniciador con microorganismos

previamente estudiados, es fundamental para pasar de un proceso de fermentación espontánea con semillas de calidad variable, a uno que permita un mayor control sobre el rendimiento del proceso y facilite la obtención de semillas que cumplan con los estándares de calidad establecidos en los mercados comerciales (De Vuyst & Weckx, 2016).

En este sentido, es de interés la selección de microorganismos con actividad pectinolítica para facilitar la degradación del mucílago de cacao, capacidad para consumir ácidos orgánicos no volátiles y producción de compuestos volátiles con notas de sabor y aroma deseables (Ouattara et al., 2020). Para abarcar todas estas funciones, es crucial que el cultivo iniciador cuente con representantes de los principales grupos de microorganismos (LEV, BAL y BAA), esto debido a que las funciones metabólicas difieren entre las especies y, a su vez, influyen de manera específica en las características del producto derivado (Agyirifo et al., 2019; D. S. Nielsen et al., 2007).

5. Estado del arte

5.1 Diversidad de microorganismos asociados a la fermentación del cacao

En el estudio de la fermentación de cacao es fundamental comprender las funciones que cumplen los diferentes microorganismos asociados a este proceso. De tal forma, los aportes que ayudaron a dilucidar el rol de estos microorganismos se encuentran en las primeras investigaciones que se centraron en el registro de los grupos microbianos presentes en la fermentación de cacao, en concordancia, con el cambio de las poblaciones dependiendo de la ubicación geográfica, condiciones ambientales y técnicas empleadas en los procesos de fermentación.

Al respecto, Roelofsen (1958) presentó uno de los primeros registros sobre las LEV predominantes en las fermentaciones de cacao realizadas en Indonesia, registró géneros como *Candida*, *Pichia*, *Saccharomyces*, *Kloeckera*, *Trichosporon* y *Schizosaccharomyces*. De igual forma, Ardhana (1990) reportó la presencia de *Kloeckera apis*, *Candida pelliculosa*, *Cándida tropicalis*, y *Saccharomyces cerevisiae* para esta misma zona geográfica. Por su parte, Gautier & Marrneissel (1998) mencionó la presencia de *Pichia membranaefaciens*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Torulopsis candida*, *Torulopsis castelli* y *Torulopsis holmii* en las fermentaciones hechas en Costa de Marfil. Luego, en el estudio de Schwan & Wheals (2004) describen que *Saccharomyces cerevisiae* es la LEV que generalmente predomina en la fermentación del cacao, y determinaron que *Kloeckera apiculata* puede crecer durante la fase temprana de la fermentación, pero disminuye rápidamente después de las 24 horas probablemente por su intolerancia al etanol en concentraciones superiores al 4% (v/v). De manera similar, en el trabajo de Lima et al., (2011), describen a *S. cerevisiae* como la especie más abundante a lo largo de la fermentación y reportaron que durante las primeras 24 h pueden encontrarse *Kluyveromyces marxianus*, *Kluyveromyces thermotolerans*, *Torulaspora pretoriensis* y *Candida sp* en un número considerable.

En relación a los primeros reportes de BAL aisladas de fermentaciones de cacao, Ostovar & Keeney (1973) establecieron que las especies de *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus plantarum*, *Leuconostoc mesenteroides* y *Lactococcus lactis* fueron las más abundantes en las fermentaciones realizadas en Trinidad y Tobago. Por otro lado, en el estudio de Passos et al., (1984) en Brasil, identificaron seis especies del género *Lactobacillus* y dos especies del género *Pediococcus*, junto con *Lactococcus lactis* y *Leuconostoc mesenteroides*. Además, mencionaron que el género *Lactobacillus* estuvo mejor representado en la etapa inicial de fermentación, mientras que las cepas de *Lactococcus lactis* se encontraron durante la etapa final.

Por último, sobre las BAA se describió que especies del género *Acetobacter* se presentaron con mayor frecuencia que las especies del género *Gluconobacter* en las fermentaciones de cacao realizadas en Brasil (Passos et al., 1984), siendo resultados acordes a lo mencionado por Ardhana (1990), que reportó las especies de *Acetobacter aceti* y *Acetobacter pasteurianus* como las más abundantes en las fermentaciones desarrolladas en Indonesia.

Cabe resaltar que las investigaciones sobre la diversidad de microorganismos asociados a la fermentación de cacao siguen siendo un campo de interés, por lo que se cuenta con una descripción más detallada sobre la importancia de cada grupo microbiano y con un mayor registro de especies. En la Tabla 3 y 4 se presentan algunas de las especies identificadas en fermentaciones de cacao realizadas en diferentes países.

Tabla 3. Especies de LEV identificadas durante la fermentación de cacao en diferentes países.

Tomado y modificado de Sarbu & Csutak, (2019)

País	Especies de LEV	Referencias
República Dominicana	<i>C. inconspicua</i> , <i>H. guilliermondii</i> , <i>Y. lipolytica</i> , <i>C. zeylanoides</i> , <i>P. fermentans</i> , <i>C. krusei</i> , <i>C. glabrata</i> , <i>H. valbyensis</i>	(Lagunes-Gálvez et al., 2007)
Ghana	<i>P. kudriavzevii</i> , <i>S. Cerevisiae</i> , <i>H. opuntiae</i> , <i>C. carpophila</i> , <i>C. orthopsilosis</i> , <i>K. ohmeri</i> , <i>M. carribica</i> , <i>P. manshurica</i>	(Daniel et al., 2009)
Brasil	<i>S. cerevisiae</i> , <i>P. kluyveri</i> , <i>H. uvarum</i> , <i>I. orientalis</i> , <i>D. etchellsii</i> , <i>K. ohmeri</i> , <i>C. orthopsilosis</i> , <i>P. kudriavzevii</i> <i>S. cerevisiae</i> , <i>C. magnoliae</i> , <i>P. kluyveri</i>	(Miguel et al., 2017; Pereira et al., 2012)
Costa de Marfil	<i>H. opuntiae</i> , <i>P. manshurica</i> , <i>P. sporocuriosa</i> , <i>I. hanoiensis</i> , <i>P. kudriavzevii</i> , <i>C. insectorum</i> , <i>Candida sp.</i> , <i>P. klyvera</i> , <i>P. fermentans</i> <i>S. cerevisiae</i> , <i>C. tropicalis</i> , <i>P. kudriavzevii</i> , <i>P. galeiformis</i> , <i>G. geotrichum</i> , <i>W. anomalus</i> <i>P. kudriavzevii</i> , <i>P. kluyveri</i> , <i>S. cerevisiae</i>	(Hamdouche et al., 2015; Koné et al., 2016)
Indonesia	<i>C. krusei</i> , <i>C. tropicalis</i> , <i>Sacch. fibuligera</i> , <i>Kloeckera sp.</i> , <i>S. cerevisiae</i>	(Jamili et al., 2016)

País	Especies de LEV	Referencias
Cuba	<i>P. manshurica</i> , <i>H. opuntiae</i> , <i>P. kundriavzevii</i> , <i>P. kluyveri</i> , <i>C. tropicalis</i> , <i>P. occidentalis</i> , <i>C. ortopsilosis</i> , <i>P. terricola</i> , <i>T. delbrueckii</i>	(Fernández-Maura et al., 2016)
México	<i>P. kudriavzevii</i> , <i>S. cerevisiae</i> , <i>Sacch. crataegensis</i> , <i>H. guilliermondii</i>	(Hernández-Hernández et al., 2016)
Ghana	<i>S. cerevisiae</i> , <i>C. glabrata</i>	(Agyirifo et al., 2019)
Costa de Marfil	<i>S. cerevisiae</i> , <i>P. fermentans</i> , <i>P. kluyveri</i> , <i>P. kudriavzevii</i> , <i>C. aaseri</i> , <i>C. tropicalis</i> , <i>H. uvarum</i>	(Ouattara & Niamké, 2021)
Colombia	<i>P. kluyveri</i> , <i>S. cerevisiae</i> , <i>H. uvarum</i> , <i>H. opuntiae</i> , <i>C. oleophila</i> , <i>C. railenensis</i> , <i>W. anomalus</i>	(Mendoza-Salazar et al., 2022)

C: *Candida*; *D:* *Debaryomyces*; *G:* *Galactomyces*; *H:* *Hanseniaspora*; *I:* *Issatchenkia*; *K:* *Kodamaea*; *Kl:* *Kloeckera*; *M:* *Meyerozyma*; *P:* *Pichia*; *S:* *Saccharomyces*; *Sacch:* *Saccharomycopsis*; *T:* *Torulaspora*; *W:* *Wickerhamomyces*; *Y:* *Yarrowia*.

Tabla 4. Especies de bacterias identificadas durante la fermentación de cacao en diferentes países.
Tomado y modificado de Sarbu & Csutak, (2019)

País	Especies de bacterias	Referencias
Indonesia	<i>L. cellobiosus</i> , <i>L. plantarum</i> , <i>A. pasteurianus</i> , <i>B. pumilus</i> , <i>B. licheniformis</i>	(Ardhana & Fleet, 2003)
República Dominicana	<i>L. plantarum</i> , <i>L. pentosus</i> , <i>L. paracasei</i> subsp. <i>paracasei</i> , <i>L. brevis</i> , <i>A. lovaniensis</i>	(Lagunes-Gálvez et al., 2007)
Ghana	<i>A. pasteurianus</i> , <i>A. senegalensis</i> , <i>A. senegalensis</i> , <i>A. syzygii</i> , <i>A. tropicalis</i> <i>L. plantarum</i> , <i>L. fermentum</i> , <i>L. brevis</i> , <i>L. mali</i> , <i>Leuc. pseudomesenteroides</i> , <i>Leuc. Mesenteroides</i> , <i>W. ghanensis</i> , <i>Ent. casseliflavus</i> , <i>Ent. Faecium</i>	(Camu et al., 2007) (De Bruyne et al., 2010)
Nigeria	<i>L. plantarum</i> , <i>L. fermentum</i> , <i>L. brevis</i> , <i>P. acidilactici</i>	(Kostinek et al., 2008)
Ecuador	<i>L. fermentum</i> , <i>Leuc. pseudomesenteroides</i> <i>F. tropaeoli</i> , <i>L. fabifermentans</i> , <i>Lc. lactis</i> , <i>L. nagelii</i> , <i>L. cacaonum</i> , <i>L. amylovorus</i> , <i>E. saccharolyticus</i> , <i>F. ficulneus</i> , <i>L. satsumensis</i> , <i>W. cibaria</i> , <i>W. fabaria</i> , <i>A. pasteurianus</i> , <i>A.</i>	(Papalexandratou et al., 2011)

País	Especies de bacterias	Referencias
	<i>senegalensis</i> , <i>A. ghanensis</i> , <i>A. fabarum</i> , <i>A. cibinongensis</i> , <i>A. malorum</i> , <i>A. cerevisiae</i> , <i>A. indonesiensis</i> , <i>A. syzygii</i> , <i>A. orientalis</i> , <i>A. lovaniensis</i> , <i>G. oxydans</i>	
Brasil	<i>L. plantarum</i> , <i>L. fermentum</i> , <i>L. casei</i> , <i>L. rhamnosus</i> , <i>L. lactis</i> , <i>L. delbrueckii</i> , <i>L. acidophilus</i> , <i>L. brevis</i> , <i>P. dextrinicus</i> , <i>L. amylovorus</i> , <i>L. reuteri</i> , <i>Lc. lactis</i> , <i>Lc. mesenteroides</i> , <i>F. pseudoficulneus</i> , <i>S. salivarius</i> , <i>P. acidilactici</i> , <i>A. aceti</i> , <i>A. pasteurianus</i> , <i>A. ghanensis</i> , <i>A. senegalensis</i> , <i>A. lovaniensis</i> , <i>A. fabarum</i> , <i>A. indonesiensis</i> , <i>A. malorum</i> , <i>A. cerevisiae</i> , <i>A. peroxydans</i> , <i>Ga. oxydans</i> , <i>G. xylinus</i> , <i>Ga. saccharivorans</i> , <i>B. licheniformis</i> , <i>B. firmus</i>	(Illegheems et al., 2012; Papalexandratou. et al., 2011; Pereira et al., 2012)
Malasia	<i>L. fermentum</i> , <i>L. plantarum</i> , <i>L. brevis</i> , <i>Lc. mesenteroides</i> , <i>Lc. Pseudomesenteroides</i> , <i>A. pasteurianus</i>	(Meersman et al., 2013)
Costa de Marfil	<i>L. plantarum</i> , <i>Leuc. mesenteroides</i> , <i>L. curieae</i> , <i>Ent. faecium</i> , <i>F. pseudoficulneus</i> , <i>L. casei</i> , <i>W. paramesenteroide</i> , <i>W. cibaria</i>	(Ouattara et al., 2017)
Ghana	<i>L. plantarum</i> , <i>A. pasteurianus</i> , <i>G. oxydans</i> , <i>Leuc. mesenteroides</i> , <i>G. diazotrophocus</i> , <i>G. hansenni</i> , <i>Leuc. citreum</i> , <i>L. brevis</i>	(Agyirifo et al., 2019)
Costa de Marfil	<i>A.pasteurianus</i> , <i>A. tropicalis</i> , <i>A. malorum</i> , <i>A. senegalensis</i> , <i>A. owinawensis</i> , <i>G. oxydans</i> , <i>A. ghanaensis</i>	(Ouattara & Niamké, 2021)
Colombia	<i>P. acidilactici</i> , <i>L. brevis</i> , <i>L. plantarum</i> , <i>L. rhamnosus</i> , <i>Leuc. Mesenteroides</i> , <i>G. japonicus</i> , <i>A. tropicalis</i> , <i>A. pasteurianus</i>	(Tovar, M. D. L. et al., 2020)

A: *Acetobacter*; B: *Bacillus*; E: *Enterococcus*; F: *Fructobacillus*; G: *Gluconobacter*; Ga: *Gluconacetobacter*; L: *Lactobacillus*; Leuc: *Leuconostoc*; Lc: *Lactococcus*; P: *Pediococcus*; S: *Streptococcus*; W: *Weisella*.

5.2 Cultivos iniciadores en la fermentación de cacao.

El desarrollo de cultivos iniciadores con diferentes especies de microorganismos se ha establecido como un importante tema de investigación, ya que su uso facilita el control de los procesos de fermentación e incrementa potencialmente la calidad de los productos derivados. Esto ha sido posible gracias a las prácticas de selección previa que determinan cuales son los mejores microorganismos para conformar estos consorcios de acuerdo a las funciones metabólicas que cumplen a lo largo del proceso.

Para la fermentación de cacao, Schwan (1998) realizó uno de los primeros estudios relacionado con el uso de un cultivo mixto compuesto por una LEV (*Saccharomyces cerevisiae*), dos BAL (*Lactobacillus lactis* y *Lactobacillus plantarum*) y dos BAA (*Acetobacter aceti* y *Gluconobacter oxydans*). Con el inóculo de estos microorganismos, se reportó un incremento de calidad en las semillas fermentadas en comparación con las semillas del proceso de fermentación artesanal. Más tarde, Leal et al., (2008) evaluaron la capacidad pectinolítica de una cepa de *Kluyveromyces marxianus*, con el fin de utilizarla como un cultivo iniciador para incrementar la degradación de pectina presente en el mucílago de cacao, acelerar el proceso de fermentación y mejorar las características sensoriales de las semillas de cacao.

En los estudios de Lefebvre et al., (2010, 2012) describen que el uso de algunas BAL y BAA podrían ser ideales para la fermentación de cacao, sin embargo, las bacterias solo se evaluaron en un medio sintético que simuló la composición del mucílago. De tal forma, para las fermentaciones con semillas de cacao adicionaron una LEV y formaron un consorcio de *Lactobacillus fermentum*, *Acetobacter pasteurianus* y *Saccharomyces cerevisiae*. Bajo estas condiciones, al final de la fermentación reportaron semillas con una calidad mayor a la obtenida en el tratamiento que utilizaron el cultivo iniciador compuesto únicamente por cepas bacterianas. Ho et al., (2014) también mencionan la importancia de las LEV en la fermentación de cacao, ya que cuando fueron inhibidas a lo largo del proceso, el producto obtenido registró notas sensoriales no deseables.

De acuerdo a Craack et al., (2014), las semillas de cacao fermentadas en presencia de un inóculo de *Pichia kluyveri* y *Kluyveromyces marxianus* se caracterizaron por un aumento significativo en la concentración de fenilacetaldehído, alcohol bencílico, alcohol fenetílico, acetato de bencilo y acetato de fenil etilo, en comparación con los datos obtenidos en la fermentación bajo condiciones artesanales. En este mismo contexto, Batista et al., (2016) indicaron que la adición de un cultivo mixto de LEV como *Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia kluyveri* y *Hanseniaspora uvarum*, influye positivamente el perfil de compuestos volátiles de las semillas de cacao fermentadas y permite la producción de chocolate con características

frutales más intensas, diferenciándose del producto de la fermentación artesanal que registró mayor astringencia.

Recientemente, en el estudio de Ouattara et al., (2020) se mencionó que el uso de *Bacillus subtilis* BS38 y *Pichia kudriazevii* YS201 facilitan la degradación de la pulpa de cacao por acción de las enzimas pectinolíticas que producen estas cepas, además de incrementar la producción de etanol en el proceso de fermentación. Con respecto a la investigación de Viesser et al., (2021), la implementación de un consorcio de una BAL con una LEV induce cambios importantes en la composición cualitativa y cuantitativa de los metabolitos consumidos y producidos en la fermentación de cacao. En tal sentido, describieron que un cultivo iniciador conformado por *Lactobacillus plantarum* LPBF35 y *Pichia fermentans* YC5.2 incrementa el consumo de azúcares residuales durante las primeras 72 h de fermentación y permite la formación de compuestos volátiles con notas sensoriales deseables.

6. Objetivos

6.1 Objetivo general

Evaluar la influencia de un cultivo iniciador mixto de microorganismos silvestres en el perfil de compuestos volátiles y no volátiles de las semillas fermentadas del cacao procedente del Municipio de los Andes, Sotomayor, Nariño.

6.2 Objetivos específicos

- Seleccionar los microorganismos con potencial fermentativo para el desarrollo del cultivo iniciador.
- Caracterizar molecularmente los microorganismos seleccionados para la formación del cultivo iniciador.
- Determinar la concentración de ácidos orgánicos no volátiles (ácido láctico, cítrico, succínico y oxálico), producidos en los diferentes tratamientos de fermentación mediante HPLC.
- Cuantificar los compuestos volátiles formados en los diferentes tratamientos de fermentación mediante SPME-HS y GC-MS.

7. Metodología

Objetivo específico 1: Selección de microorganismos con potencial fermentativo para el desarrollo del cultivo iniciador. Para el cumplimiento de este objetivo se desarrollaron las siguientes actividades:

7.1 Lugar de muestreo

Para la colecta de las muestras de cacao se utilizaron frutos de la variedad ICS 95 (*imperial college selection*) híbrido trinitario/criollo, provenientes de la finca la Bega, ubicada en la vereda El Placer del municipio de los Andes, Sotomayor (1°32'50.5"N - 77°28'0.055"W). Este municipio está ubicado en la región andina del departamento de Nariño y tiene una temperatura promedio anual entre 25 a 27 °C, una humedad relativa entre 0 a 36% y una precipitación entre 30 a 50 % (Weather Spark, 2022). Las muestras se obtuvieron de fermentaciones bajo condiciones artesanales realizadas en la zona; proceso que se clasifica como un sistema de fermentación en estado sólido, en el cual, las semillas recuperadas de frutos de cacao maduros de la variedad ICS 95 se depositan en cajones de madera con las siguientes dimensiones: altura 55 cm, ancho 40 cm y largo 55 cm, para una capacidad aproximada de 120 L. La fermentación tiene una duración de 7 días y a partir de las cada 48 horas del proceso se mezcla de forma homogénea la masa fermentable.

Fueron muestreados por triplicado 5 cajones de fermentación de la finca La Bega de forma aleatoria, para tal efecto, de diferentes puntos de profundidad (10, 20, 30 40 y 50 cm) se colectaron submuestras de 100 g de semillas de cacao fermentadas con mucilago, para la obtención de una muestra compuesta con un total de 500 g. El muestreo se realizó a las 24, 48, 72 y 96 horas de fermentación. En total se colectaron 60 muestras que se trasladaron bajo refrigeración al laboratorio de Biotecnología Microbiana de la Universidad de Nariño para continuar con el proceso de aislamiento y purificación de microorganismos.

7.2 Aislamiento y purificación de microorganismos

Para el aislamiento de microorganismos se utilizaron 20 g de cada muestra con respecto al tiempo de colecta y se mezclaron con 200 mL de agua estéril para homogeneizar cada una de estas. Se utilizó 1 mL de la solución resultante para realizar diluciones seriadas hasta 10^6 en agua estéril y de cada dilución se inoculó una alícuota de 0.1 mL por el método de siembra en superficie con perlas estériles en medios de cultivo selectivos. De tal forma, para el cultivo de LEV se utilizó agar YGC [extracto de levadura 0.5%, glucosa 2%, cloranfenicol 0.01%], para BAL agar MRS (Man, Rogosa y Sharpe) y para las BAA se modificó el agar DMS (Desoxicolato, Manitol y Sorbitol) [0.1% sorbitol, 0.1% manitol, 0.5% extracto de levadura, 1.5% peptona bacteriológica, 0.5% glucosa, 0.5% etanol, 0.3% ácido acético].

La purificación de los microorganismos se realizó por la técnica de agotamiento (siembra en estría cruzada), el tiempo de incubación se controló de 48 a 72 h dependiendo el tipo de microorganismo y se mantuvo una temperatura constante de 30 °C. Adicionalmente, para los aislados bacterianos se realizó tinción de Gram y prueba de catalasa, esto con el objetivo de corroborar la pureza de los aislados. Posteriormente todos los microorganismos purificados fueron conservados en glicerol con una proporción 1:1 y se almacenaron a -20°C.

7.3 Selección de microorganismos

7.3.1 Levaduras

Antes de cada ensayo, las colonias de LEV se activaron en caldo YGC y se incubaron en shaker (Marca Dies, modelo 5H6) durante 48 h con agitación constante de 120 rpm y una temperatura de 30 °C. Las células se recolectaron mediante centrifugación a 4000 rpm durante 15 min, se eliminó el sobrenadante y se suspendieron en solución salina peptonada, para ajustar cada inóculo a una concentración de 3.9×10^7 células.mL⁻¹ mediante microscopía con una cámara de Neubauer.

El primer filtro de selección de LEV se realizó de acuerdo a dos criterios: mayor actividad de la enzima pectina metilesterasa (PME) y mayor crecimiento en un medio con pectina como única fuente de sustrato.

Para determinar la actividad de la enzima PME se modificó la metodología propuesta por Masoud & Jespersen, (2006). Previamente, cada LEV se inoculó en 40 mL de medio YPP [5,0 g extracto de levadura, 7,0 g peptona bacteriológica, 5,0 g pectina, 1 L de agua destilada ajustada a pH 5,5], y se incubaron durante 48 h en shaker a 120 rpm y 30 °C. De cada aislado se centrifugó 10 mL a 4000 rpm durante 40 min y el sobrenadante libre de células se utilizó para el ensayo de actividad enzimática. Se agregó 5 mL del sobrenadante a 20 mL de una solución compuesta por pectina a 1% (p/v) y cloruro de sodio 0.1 M, el pH se ajustó a 7.5. Pasados 30 min, cada experimento se tituló con NaOH 0.1M hasta alcanzar de nuevo un pH de 7,5. El método de titulación se empleó para determinar el aumento de la acidez como producto de la liberación de grupos carboxilo formados por la acción de la enzima PME en el medio con pectina. A partir de ello, la actividad enzimática para cada LEV se calculó mediante la ecuación 1 (Ec. 1) y los resultados se expresaron como unidades enzimáticas (U) por volumen (mL); en donde una unidad se define como la cantidad de enzima que libera 1 μ mol de grupos carboxilo.min⁻¹ (Salas-Tovar et al., 2017):

$$\text{PME (U.mL}^{-1}\text{)} = (\text{mL NaOH}) (\text{NaOH M}) (1000) / (\text{Tiempo h}) (\text{Vol total}) \text{ (Ec. 1)}$$

Para identificar las LEV con mayor crecimiento en un medio con pectina, cada aislado se inoculó en 25 mL de una solución al 1% de pectina y se incubaron durante 48 h en shaker a 120 rpm y 30 °C. Alcanzadas las 48 h, el crecimiento se determinó por unidades de absorbancia a una longitud de onda de 620 nm (Blanco et al., 1999).

Luego, con las LEV que registraron la mayor actividad de PME y las mayores tasas de crecimiento, se finalizó el proceso de selección evaluando la actividad de la enzima pectina liasa (PL). Para este proceso también fue necesario la obtención del sobrenadante libre de células de cada aislado tal como se describe en el ensayo de PME. Posteriormente, se añadieron 10 mL de cada sobrenadante en 10 mL de una solución compuesta de pectina al 0.25% (p/v), tampón Tris-HCl 0.1 M y ajustada a un pH 7,5 (Masoud & Jespersen, 2006). La actividad enzimática de la PL se midió por espectrofotometría con el aumento de la densidad óptica al cabo de los 30 min a una longitud de 235 nm, esto debido a la formación de oligogalacturonidos 4,5-insaturados como producto de la despolimerización de la molécula de pectina mediante el mecanismo de eliminación β . El coeficiente de extinción molar $5,5 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ se utilizó para cuantificar las U.mL^{-1} , en donde una unidad se define como la cantidad de enzima que libera 1 μmol de producto insaturado. min^{-1} (Yadav et al., 2009)

Todos los procedimientos se realizaron por triplicado para cada LEV. Para la selección se aplicaron métodos estadísticos como se describe en el epígrafe 7.13

7.3.2 Bacterias ácido lácticas y bacterias ácido acéticas

Previo a la ejecución de los diferentes ensayos, las BAL se activaron en caldo MRS y las BAA en caldo DMS modificado, la incubación se realizó durante 72 h con agitación constante a 120 rpm y una temperatura de 30° C. Las células se recolectaron mediante centrifugación a 4000 rpm durante 15 min, se eliminó el sobrenadante y se suspendieron en una solución salina peptonada, para ajustar cada inóculo a una concentración de $2.4 \times 10^7 \text{ células.mL}^{-1}$ mediante microscopía con una cámara de Neubauer.

Como primer filtro de selección de las BAL se identificó la presencia de un metabolismo heterofermentativo, para tal efecto, se modificó la metodología propuesta por Ouattara et al., (2014). Cada aislado se inoculó por punción en tubos de ensayo con agar MRS y se incubaron durante 72 h a 30°C. La producción de gas (CO_2) en la base del tubo se interpretó como la presencia de un metabolismo heterofermentativo en las BAL.

Por otro lado, como primer filtro de selección para las BAA, se evaluó la capacidad de oxidar lactato y acetato según el método propuesto por (Gerard, 2015). Para tal efecto, cada aislado se inoculó en un medio líquido compuesto por peptona a 0.3% (p/v), extracto de levadura 0.2% (p/v), y las concentraciones de

lactato y acetato se ajustaron a 1%, 2% y 3% (v/v); como indicador de pH se utilizó 0.002% de púrpura de bromocresol y se llevó a incubación por 120 h a 30°C. El cambio de color de amarillo a púrpura en el medio se interpretó como prueba positiva.

Posteriormente, con las BAL heterofermentativas se evaluó la producción de ácido láctico y con las BAA que oxidaron acetato/lactato a la mayor concentración, se evaluó la producción de ácido acético. Para esto, las BAL se inocularon en 200 mL de caldo MRS y las BAA se inocularon en 200 mL de caldo DMS; la cuantificación del ácido láctico y acético respectivamente, se realizó titulando 5 mL de muestra con NaOH 0.1M hasta alcanzar un pH de 8,0. Las muestras se tomaron a las 24 h, 48 h, 72 h, 96 h y 120 h (Gerard, 2015).

Como último paso de selección se evaluó el crecimiento de las bacterias con respecto a los principales sustratos que pueden encontrarse en la fermentación de cacao, modificando la metodología propuesta por Lagunes Gálvez et al., (2007). Para ello, cada aislado se inoculó en un medio compuesto por 10 g de semillas de cacao con mucílago previamente trituradas en 200 mL de agua estéril. El crecimiento se determinó por recuento celular en cámara de Neubauer cada 4 h durante 48 h.

Todos los procedimientos se realizaron por triplicado para cada BAL y BAA. Para la selección de los aislados bacterianos se aplicaron métodos estadísticos como se describe en el epígrafe 7.13

Objetivo específico 2: Caracterización molecular de los microorganismos seleccionados para la formación del cultivo iniciador. Para el cumplimiento de este objetivo se desarrollaron las siguientes actividades:

La caracterización molecular se realizó para los aislados que pasaron el primer filtro de selección en cada grupo microbiano. Es decir, las LEV con mayor actividad enzimática de PME y mayor crecimiento en pectina a 1%; las BAL con metabolismo heterofermentativo; y las BAA con capacidad de oxidar acetato y lactato a 3 %. Esto con el objetivo de obtener una identificación molecular más aproximada de los microorganismos mencionados y finalizar la selección para la conformación del cultivo iniciador.

7.4 Extracción de ADN y amplificación de la región ITS1-5.8S ARNr-ITS2 y el dominio D1/D2 (26S) de LEV

Previo al proceso de extracción de ADN, las LEV se inocularon en agar YPG durante 48 h a 30°C y las colonias se suspendieron en 1.5 mL de agua ultrapura para centrifugar a 14.000 rpm durante 2 min. Se descartó el sobrenadante y con las células precipitadas se realizó la extracción de ADN utilizando el *Kit Wizard® Genomic DNA Purification* (Promega) siguiendo el protocolo del fabricante. La extracción de

ADN se verificó por electroforesis en gel de agarosa a 1%, para cargar cada pozo se tomaron 2 μ L de cada muestra de ADN y se mezclaron con 1 μ L TE 1X (Research Products), 1 μ L de azul de bromofenol (Promega) y 1 μ L EZ-vision (Amresco). Las condiciones de corrida se ajustaron a 100V durante 1 h, se utilizó buffer TBE 1X (Promega) y como referencia de tamaño molecular se utilizó la escalera *Thermo Scientific™ GeneRuler 1 kb Plus DNA Ladder*. Las muestras de ADN se visualizaron a 320 nm en un transiluminador UV (Fisher Scientific) y se ajustaron a una concentración de 80 ng. μ L⁻¹ para realizar la reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

Los procesos de PCR se realizaron de acuerdo con la metodología propuesta por Jespersen et al., (2005b). Para amplificar la región que comprende los espaciadores transcritos internos del gen ribosomal 5.8S (ITS1-5.8S ARNr-ITS2), las condiciones finales de la reacción PCR se ajustaron con: 25 μ L de *GoTaq G2 Green Master Mix* 1X (Ref: M7822, Promega), 1 μ L del cebador ITS1 a 0.2 μ M (5'-TCC GTA GGT GAA CCT GCG G-3'), 1 μ L del cebador ITS4 a 0.2 μ M (5'-TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC-3'), 2 μ L del template de ADN a 3.2 ng. μ L⁻¹ y 21 μ L de agua ultrapura para un total de 50 μ L por reacción. Las condiciones de termociclado se configuraron de la siguiente manera: desnaturalización inicial a 94 °C durante 3 min; 30 ciclos de desnaturalización a 94 °C por 2 min, anillamiento a 60 °C por 1 min, extensión a 72 °C por 2.5 min; extensión final a 72 °C durante 7 min; y refrigeración a 4 °C.

Para el dominio D1/D2 de la subunidad ribosomal 26S (D1/D2 ARNr 26S), las condiciones finales de la reacción PCR fueron: 25 μ L de *GoTaq G2 Green Master Mix* 1X (Ref: M7822, Promega), 1 μ L del cebador NL-1 a 0.2 μ M (5'-GCA TAT CAA TAA GCG GAG GAA AAG-3'), 1 μ L del cebador NL-4 a 0.2 μ M (5'-GGT CCG TGT TTC AAG ACG G-3'), 2 μ L del template de ADN a 3.2 ng. μ L⁻¹ y 21 μ L de agua ultrapura para un total de 50 μ L por reacción. El programa de termociclado se ajustó de la siguiente forma: desnaturalización inicial a 94 °C durante 3 min; 36 ciclos de desnaturalización a 94 °C por 2 min, anillamiento a 52 °C por 1 min, extensión a 72 °C por 2 min; extensión final a 72 °C durante 7 min; y refrigeración a 4 °C.

El tamaño y la concentración aproximada de los amplicones se verificó por electroforesis bajo las condiciones anteriormente descritas, utilizando la escalera *Thermo Scientific™ GeneRuler 100 bp Plus DNA Ladder* como referencia de tamaño molecular. Los amplicones se enviaron a CorpoGen (Contrato: HC00179495) para su respectiva purificación y secuenciación por el método *Sanger*.

7.5 Extracción de ADN y amplificación del gen 16S de BAL y BAA

Previo al proceso de extracción de ADN, las BAL se inocularon en agar MRS y las BAA en agar DMS durante 48 h a 30 °C, las colonias de cada bacteria se suspendieron en 1.5 mL de agua ultrapura y se

centrifugaron a 14.000 rpm durante 2 min. Se descartó el sobrenadante y con las células precipitadas se desarrolló la extracción de ADN utilizando el *Kit GenElute™ Bacterial Genomic* (Sigma) siguiendo el protocolo del fabricante. La extracción de ADN se verificó por electroforesis en gel de agarosa a 1% bajo las condiciones descritas en el epígrafe 7.4.

Para amplificar el gen 16S ARNr de los aislados, las condiciones de reacción se establecieron de acuerdo a lo descrito en el epígrafe 7.4, utilizando los cebadores respectivos para cada grupo bacteriano. De tal forma, para las BAL se utilizaron los cebadores 27F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') y 1495R (5'-CTACGGCTACCTTGTACGA-3'), bajo las siguientes condiciones de termociclado: desnaturalización inicial a 94 °C durante 5 min; 35 ciclos de desnaturalización a 94 °C por 1 min, anillamiento a 58 °C por 1 min, extensión a 72 °C por 2 min; extensión final a 72 °C durante 10 min; y refrigeración a 4 °C (Yu et al., 2009). Para las BAA se utilizaron los cebadores 16Sd (5'-GCTGGCGGCATGCTTAACACAT-3') y 16Sr (5'-GGAGGTGATCCAGCCGAGGT-3'), bajo el siguiente programa de termociclado: desnaturalización inicial a 95 °C durante 2 min; 30 ciclos de desnaturalización a 95 °C por 30 s, anillamiento a 51 °C por 30 s, extensión a 72 °C por 2 min; extensión final a 72 °C durante 5 min; y refrigeración a 4 °C (Ruiz et al., 2000).

Del mismo modo, la verificación de los amplicones por electroforesis y su posterior secuenciación se realizó de acuerdo a las condiciones descritas en el epígrafe 7.4.

7.6 Edición de secuencias e identificación de los aislados

Las secuencias de los diferentes grupos microbianos se editaron en el software *Chromas Pro* V.2.01 para establecer la correcta correlación entre las bases nitrogenadas y los picos de detección en el cromatograma, en caso de ser necesario, se eliminaron las regiones con baja calidad determinadas según el programa. Posteriormente, para la identificación de cada aislado microbiano, las secuencias editadas se compararon con las secuencias disponibles en la base de datos del *GenBank* del NCBI utilizando la herramienta de búsqueda básica de alineación local (BLAST) (Fecha de acceso: 08/11/2021); se tuvieron en cuenta los siguientes parámetros: porcentaje de identidad, valor E, cobertura de alineamiento y puntaje máximo. Por último, las secuencias fueron registradas en la base de datos del NCBI para la obtención de los códigos de acceso respectivos (Tabla 8, 9 10 y 11).

7.7 Construcción de árboles filogenéticos

Para la construcción de los árboles de filogenéticos, las secuencias de las diferentes regiones amplificadas se alinearon en el programa *BioEdit* V.7.2. De tal forma, para LEV se realizó un árbol con respecto a la

región ITS1-5.8S ARNr-ITS2 y otro para el dominio D1/D2 ARNr (26S); en el caso de BAL y BAA, se construyó un árbol para cada grupo bacteriano de acuerdo con las secuencias del gen 16S ARNr. Los análisis de distancias se ejecutaron bajo el método de *Neighbor-joining* con los siguientes parámetros en el software *PAUP*: *Distance measure: Maximum-likelihood; Objective function: Unweighted least squares; Neg. branch lengths: Allow negative branch lengths - Set to zero; Missing/Ambig: Distribute proportionally; Resampling method: Bootstrap 1000 reps.* Los modelos de sustitución nucleotídica se determinaron según el criterio de información bayesiana (BIC) en el software *JModelTest* V.2.1.10. Adicionalmente, se utilizaron secuencias de referencia de la base de datos del *GenBank* para establecer las raíces internas y externas en cada análisis (Tabla 5).

Tabla 5. Secuencias de referencia y modelos de sustitución nucleotídica para la construcción de los árboles filogenéticos por *Neighbor-joining* para cada grupo microbiano.

Grupo	Región	Raíces internas		Raíz externa		Modelo evolutivo
		Nombre científico	Código <i>Genbank</i>	Nombre científico	Código <i>Genbank</i>	
BAL	ITS1-5.8S ARNr-ITS2	<i>S. cerevisiae</i> ATCC 4098	KU729087.1 NR_111250.1	<i>Penicillium expansum</i> ATCC 7861	NR_077154.1	HKY85 + G (gama shape= 0.895; p-invar= 0.00)
		<i>C. tropicalis</i> CBS 94	KP780450.1			
		<i>C. glabrata</i> ATCC 90876	NR_131315.1			
		<i>P. kudriavzevii</i> ATCC 6258				
	D1/D2 ARNr (26S)	<i>S. cerevisiae</i> ATCC 96581	KU729190.1 KU729171.1	<i>Penicillium expansum</i> CBS 325.48	NG_069649.1 8	TIM3 + G (gama shape= 0.440; p-invar= 0.00)
		<i>C. tropicalis</i> ATCC 13803	NG_055062.1 KU729202.1			
		<i>C. glabrata</i> ATCC 2001				
		<i>P. kudriavzevii</i> ATCC 34135				
	16S ARNr	<i>L. brevis</i> ATCC 14869	NR_044704.2 NR_042394.1	<i>Escherichia coli</i> ATCC 11229	GQ340751.1	HKY85 + G (gama shape= 0.271; p-invar=0.00)
		<i>L. plantarum</i> NRRL B-14768				
BAA	16S ARNr	<i>A. fabarum</i> R-36330	NR_042678.1	<i>Escherichia coli</i> ATCC 11229	GQ340751.1	HKY85 + I + G (gama shape= 0.259; p-invar= 0.470)
		<i>A. okinawensis</i> WK309	KX214639.1 NR_036881.1			
		<i>A. tropicalis</i> Ni-6b				

7.8 Análisis *in-silico* con cortes con enzimas de restricción

Los análisis *in-silico* de polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción (RFLP) se realizaron en el software *pDRAW32* V.1.1.147 con las secuencias correspondientes a cada una de las regiones amplificadas de los diferentes grupos microbianos. Por tanto, según la región y el grupo microbiano, se seleccionaron 5 enzimas de restricción bajo los siguientes criterios: que generen más de un corte y que dichos cortes se presenten en la totalidad de las secuencias (Tabla 13). El número de cortes y el tamaño de los fragmentos generados se verificaron en geles de agarosa *in-silico* con la siguiente configuración: *Gel %: 2.5; Min bp: 25; DNA MWMarker: Invitrogen 50pb DNA Ladder*.

Con los patrones de bandas de RFLP se realizó una matriz de presencia-ausencia con respecto al tamaño de los fragmentos formados por las diferentes enzimas de restricción para cada región analizada. Además, se incorporó información correspondiente a las características metabólicas de los grupos microbianos, a saber: actividad enzimática de PL para LEV; producción de ácido láctico para BAL; y por último, crecimiento en medio con mucílago de cacao para BAA. Posteriormente, para cada matriz se realizó un análisis de agrupamiento según el coeficiente de *Sorensen-Dice* en el software *RStudio* V.1.4.1106, a fin de encontrar el nivel de similitud entre los aislados evaluados.

7.9 Desarrollo del cultivo iniciador

Para la formación del cultivo iniciador, de cada grupo microbiano se escogieron los aislados que cumplieron con todos los criterios de selección. En tal sentido, se seleccionaron los aislados de LEV con la mayor actividad pectinolítica, es decir, con mayor actividad de la enzima PME, PL y mayor crecimiento; entre las BAL se seleccionó el aislado que presentó un metabolismo heterofermentativo, baja producción de ácido láctico y el mayor crecimiento en el medio con mucílago de cacao. Finalmente, se seleccionó el aislado de la BAA con capacidad de oxidar acetato y lactato a la mayor concentración, baja producción de ácido acético y el mayor crecimiento en el medio con mucílago de cacao.

Objetivo específico 3: Determinación por HPLC (*High performance liquid chromatography*) de la concentración de ácidos orgánicos no volátiles producidos en los diferentes tratamientos de fermentación. Objetivo específico 4: Cuantificación mediante SPME-HS (*solid phase extraction with headspace*) y GC-MS (*Gas Chromatography coupled to Mass Spectrometry*) de compuestos volátiles formados en los diferentes tratamientos de fermentación. Para los objetivos específicos 3 y 4 se realizaron las siguientes actividades:

7.10 Diseño experimental de los procesos de fermentación

Para todos los tratamientos se colectaron frutos de cacao ICS 95 antes de su madurez total y se seleccionaron sólo aquellos con ausencia de daños y/o contaminación. Los procesos de fermentación tuvieron una duración de 8 días y la temperatura se controló a un valor aproximado de 30°C. En todos los ensayos se utilizaron cajones de madera como fermentadores y a partir de las 48 h de fermentación las semillas se mezclaron diariamente con el fin de homogeneizar la masa fermentable.

Se llevó a cabo un diseño totalmente aleatorizado con tres tratamientos y tres réplicas, para un total de 9 unidades experimentales. Los tratamientos fueron: Tratamiento 1 (T1): Fermentación artesanal en el municipio de Los Andes, Sotomayor (FN); Tratamiento 2 (T2): Fermentación artesanal más el cultivo iniciador en el municipio de Los Andes, Sotomayor (FN+CI); y Tratamiento 3 (T3): Fermentación bajo condiciones de laboratorio con el cultivo iniciador (CI), para este caso, previo a la apertura de los frutos, se realizaron lavados con hipoclorito de sodio a 0.5 % (v/v), alcohol etílico 70% (v/v) y agua destilada para eliminar los microorganismos presentes en la cáscara. Cada réplica estuvo compuesta por 15 kg de semillas de cacao con mucílago y para los tratamientos con presencia del cultivo iniciador, los microorganismos seleccionados se inocularon al inicio de la fermentación con concentraciones celulares de 5×10^5 células.g⁻¹ para bacterias (BAL y BAA) y 1×10^6 células.g⁻¹ para LEV, tal como lo describen Craack et al., (2013).

Para la extracción de los compuestos volátiles y no volátiles de las semillas fermentadas, se recolectaron aleatoriamente varias submuestras hasta completar 100 g de cada unidad experimental. El muestreo se realizó a las 24, 96, y 192 h de fermentación; adicionalmente, para los compuestos no volátiles se tomaron muestras a las 48, 72, 120, 144, 168 h de fermentación.

7.11 Extracción y cuantificación de ácidos orgánicos no volátiles

Para la extracción de los ácidos orgánicos no volátiles (ácido láctico, cítrico, succínico y oxálico) se modificó la metodología descrita por Camu et al., (2007) y Ho et al., (2015). La preparación del extracto se realizó de la siguiente manera: de cada tratamiento se obtuvieron 5.0g de semillas trituradas en un molino A10 *Analysemühle*. Las muestras fueron homogeneizadas con 25 mL de agua grado HPLC en vortex durante 30 s y se centrifugaron a 7800 rpm durante 1 h. El sobrenadante recuperado se mezcló con acetonitrilo grado HPLC en una proporción 1:1 y se centrifugó nuevamente durante 30 min a 14800 rpm. Por último, se recuperó nuevamente el sobrenadante y se utilizaron filtros de nylon de 0.22 µm para obtener los extractos que se almacenaron a -40 °C hasta el momento del análisis.

El proceso de cuantificación se realizó en el Laboratorio Especializado de Cromatografía de la Universidad de Nariño siguiendo la metodología propuesta por Rodríguez-Campos et al., (2011). El cromatógrafo de líquidos HPLC *Waters Breeze* de Bomba Binaria 1525, estuvo equipado con un inyector *Rheodyne 7725I* con Loop de 20 μ L y una columna *LUNA C18(2) Phenomenex* (250mm x 4.6 mm x 5,4 μ m) 100 Å°. Como fases móviles se utilizaron buffer fosfato de sodio monobásico 0.02 M (disolvente A) y acetonitrilo a 100% (v/v) (disolvente B), con un flujo de 0.8 mL.min⁻¹ y elución isocrática. La absorbancia de la muestra se midió a 210 nm y la identificación de los analitos se realizó por comparación de los tiempos de retención y los espectros de absorción UV-Vis de acuerdo con los estándares de cada compuesto. Para la cuantificación de los ácidos se emplearon las curvas de calibración previamente construidas por el laboratorio especializado con el estándar correspondiente para cada ácido orgánico no volátil (Sigma-Aldrich pureza $\geq$ 99.9%).

7.12 Extracción y cuantificación de compuestos volátiles

Para preparar las muestras de extracción se trituraron semillas hasta obtener 8,0 g de cada tratamiento de fermentación y se almacenaron en viales ámbar sellados herméticamente de 40 mL a una temperatura de -40°C hasta el momento del análisis. Los procesos de extracción y cuantificación de compuestos volátiles se realizaron en el Laboratorio Especializado de Cromatografía de la Universidad de Nariño, siguiendo la metodología reportada por Rodríguez-Campos et al., (2011).

Cada vial se sometió a una micro extracción en fase sólida en el espacio de cabeza (SPME-HS) con una fibra mixta de 50/30 μ m de divinilbenceno/carboxeno/polidimetilsiloxano (DVB/CAR/PDMS). Posteriormente, los compuestos retenidos en la fibra se analizaron mediante cromatografía de gases y espectrometría de masas (GC-MS) con una columna DB-WAX (*J&W Scientific*, 30m x 0.25mm x 0.25 μ m). Se utilizó helio de alta pureza como fase móvil con un flujo de 1 mL.min⁻¹, el modo de inyección *splitless* se ajustó a 240 °C y el detector de masas selectivo fue un QP2010S (*full scan*) con un sistema electrónico de ionización por impacto a 70 eV. La identificación de los compuestos de interés se realizó por comparación de los espectros de masas, empleando la base de datos NIST y WILEY; además, del cálculo de los índices de retención y su comparación con los reportados en la literatura.

7.13 Análisis estadístico

Se utilizó el software *RStudio* V.1.4.1106 para llevar a cabo los diferentes análisis estadísticos. El tratamiento de los datos se realizó dependiendo de los parámetros del análisis empleado. Para los análisis univariados, se evaluó el supuesto de normalidad (Test de Shapiro–Wilk) y homocedasticidad (Prueba de

Levene), y en caso de ser necesario, se realizó la transformación logarítmica o de raíz cuadrada de los datos. Dependiendo de esto, se seleccionó la prueba para el análisis de varianza con un nivel de confianza del 95 % (Prueba paramétrica: ANOVA simple; Prueba no paramétrica: Kruskal Wallis), y para complementar el análisis, se aplicó una prueba de rangos múltiples (Test de Tukey para la prueba paramétrica; Test de Duncan para la prueba no paramétrica). Para los análisis multivariados: análisis de conglomerados por k-medias y análisis de componentes principales (ACP), los datos fueron normalizados para evitar que la escala de una variable tenga mayor influencia sobre otra. En el análisis de conglomerados por k-medias, el número adecuado de grupos a formarse se determinó según el método del codo y se utilizó una matriz de distancias euclidianas para la separación de los grupos. En el ACP, el número de componentes a retener se determinó de acuerdo al Eigenvalor y al porcentaje de varianza acumulada de los datos (Facundo et al., 2020).

Durante la fase selección de las LEV se realizaron los siguientes análisis: con los datos de actividad enzimática de PME y las medidas de crecimiento cuantificadas por absorbancia en el medio con pectina a 1%, se realizó el análisis de conglomerados por k-medias para identificar el grupo de aislados con los mayores resultados para las dos variables. Adicionalmente, se desarrolló un análisis de varianza con los datos normalizados de las dos variables para confirmar la presencia de diferencias estadísticamente significativas entre los grupos formados. Por último, se utilizó un análisis de varianza para comparar entre la actividad de la enzima PL de las LEV que conformaron el grupo de interés. En el proceso de selección de los aislados bacterianos se emplearon tres análisis de varianza: el primero para comparar la producción de ácido acético entre los aislados de BAA; el segundo para comparar la producción de ácido láctico entre los aislados de BAL; y el tercero para comparar el crecimiento celular de todas las bacterias en el medio con mucílago de cacao.

Finalmente, se implementó un análisis de varianza para determinar diferencias significativas entre la concentración de ácidos orgánicos no volátiles producidos y un ACP para establecer las relaciones entre los compuestos volátiles formados en los diferentes tratamientos de fermentación.

8. Resultados

8.1 Selección de microorganismos con potencial fermentativo para el desarrollo del cultivo iniciador

8.1.1 Aislamiento y purificación de microorganismos

Se obtuvieron un total de 129 aislados microbianos, de los cuales, 80 corresponden a LEV, 23 a BAL y 26 a BAA. Las LEV y BAL se aislaron principalmente de las muestras colectadas a las 24 y 48 h de fermentación, y las BAA corresponden en su mayoría a las muestras con 72 y 92 h de fermentación. Con respecto a la tinción de Gram, todas las BAL se caracterizaron como Gram positivas y todas las BAA como Gram negativas. Caso contrario se registró con la prueba de catalasa, en donde las BAL presentaron actividad catalítica negativa y las BAA una actividad catalítica positiva.

8.1.2 Selección de microorganismos

8.1.2.1 Levaduras.

A través del análisis de conglomerados por k-medias, se formaron 6 grupos que se diferencian con respecto a la actividad enzimática de PME y el crecimiento en el medio con pectina a 1 % (Tabla 6). Cabe destacar que la presencia de diferencias estadísticamente significativas tanto con los resultados de actividad enzimática de PME como con los resultados de crecimiento, se encuentra respaldada por el análisis de ANOVA simple que registró un p-valor menor a 0.05 para ambos casos. Además, con el Test de Tukey se corroboró que los 20 aislados del grupo 5 se encuentren dentro de un sólo grupo homogéneo con un nivel de confianza del 95 %.

Tabla 6. Actividad enzimática de PME y crecimiento en pectina a 1% de los aislados de LEV.

Grupo	Código aislado LEV	Promedio de Actividad enzimática PME U.mL ⁻¹ ± SD	Promedio de crecimiento en unidades de absorbancia ± SD
1	L5 - L6 - L7 - L15 - L18 - L21 - L45 - L46 - L50 - L56 - L71 - L75 - L80	4.4 ± 0.05	1.03315 ± 0.005
2	L11 - L19 - L25 - L39 - L40 - L42 - L53 - L57 - L59 - L60 - L62 - L70 - L72 - L76	6.48571 ± 0.23	1.01079 ± 0.003
3	L1 - L16 - L26 - L38 - L41	2.72 ± 0.19	1.0202 ± 0.002
4	L2 - L8 - L14 - L20 - L23 - L24 - L29 - L31 - L33 - L43 - L47 - L55 - L66 - L74 - L77 - L78	4.73 ± 0.5	1.23619 ± 0.003

Grupo	Código aislado LEV	Promedio de Actividad enzimática PME U.mL ⁻¹ ± SD	Promedio de crecimiento en unidades de absorbancia ± SD
5	L4 - L9 - L10 - L13 - L27 - L28 - L32 - L34 - L35 - L36 - L37 - L44 - L51 - L58 - L64 - L67 - L68 - L69 - L73 - L79	7.21 ± 0.32	1.52645 ± 0.004
6	L3 - L12 - L17 - L22 - L30 - L48 - L49 - L52 - L54 - L61 - L63 - L65	2.90267 ± 0.11	1.21408 ± 0.001

De tal manera, el grupo 5 está conformado por las LEV con la mayor actividad enzimática de PME y el mayor crecimiento, al registrar valores promedio de 7,21 U.mL⁻¹ y 1.52 respectivamente. El grupo 2 presentó una actividad enzimática de 6.49 U.mL⁻¹, sin embargo, tiene el menor valor de crecimiento con una absorbancia de 1.01. Por otro lado, el grupo 3 presentó la menor actividad enzimática de 2,72 U.mL⁻¹ y registró uno de los menores valores de crecimiento (Figura 1).

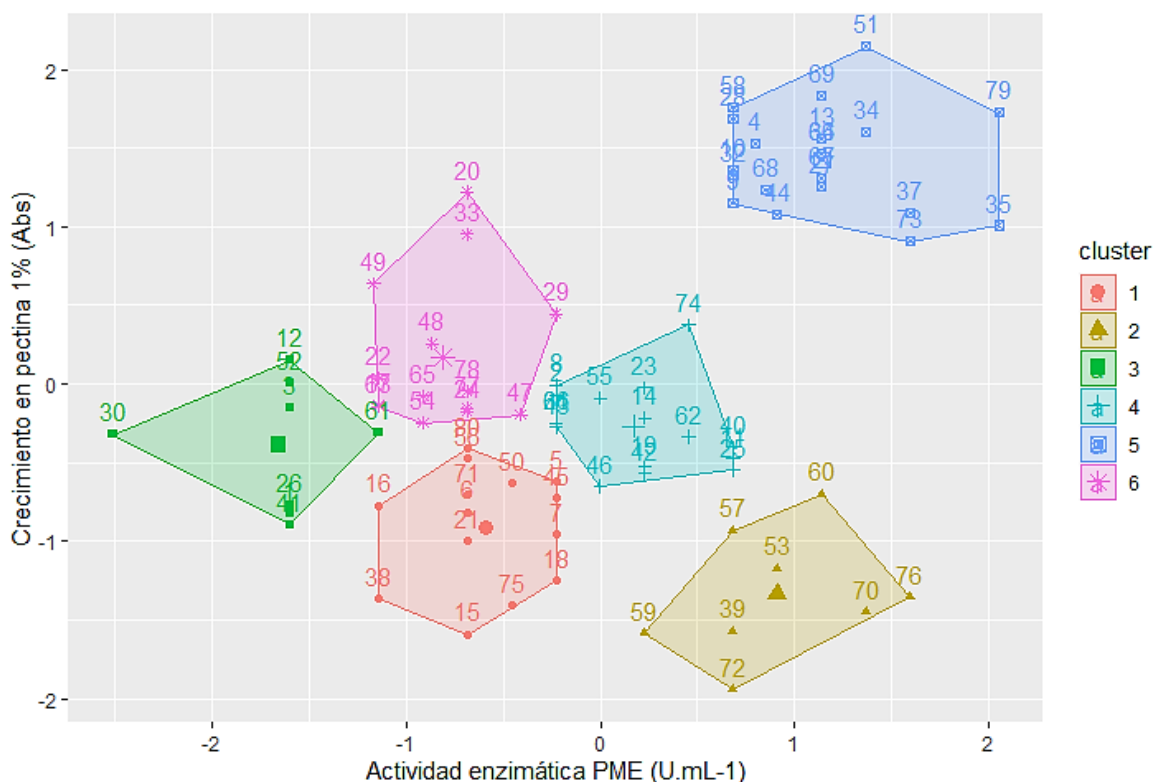


Figura 1. Agrupación de LEV por el método k-medias respecto a la actividad enzimática de PME y el crecimiento en pectina al 1%. Los valores de los ejes se encuentran normalizados para cada variable (fuente: esta investigación).

Con los 20 aislados del grupo 5 se determinó la actividad enzimática de PL y de acuerdo con el análisis de ANOVA simple (p-valor 0.00) se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre estas LEV. De manera complementaria, con el Test de Tukey se identificaron 3 grupos homogéneos, de los cuales, el grupo A presentó la mayor actividad enzimática con valores entre 0.125 hasta 0.128 U.mL⁻¹, seguido del grupo B con valores entre 0.112 hasta 0.113 U.mL⁻¹, y, por último, el grupo C que presentó la menor actividad enzimática con valores de 0.103 y 0.105 U.mL⁻¹ (Figura 2).

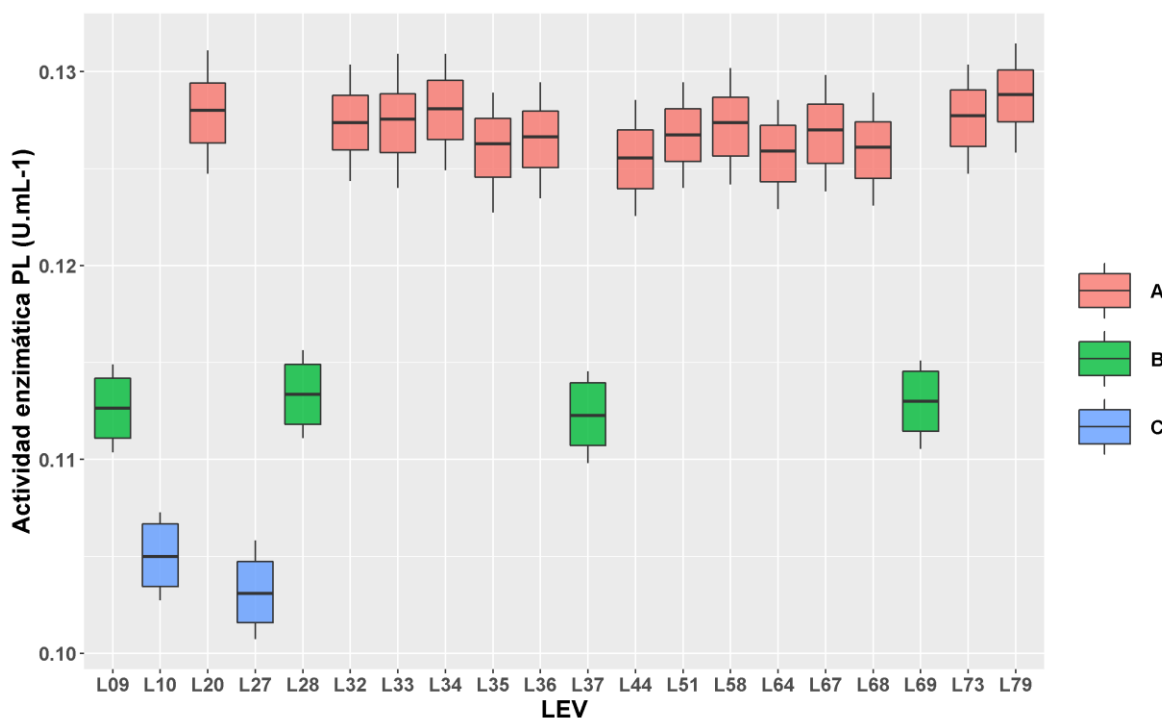


Figura 2. Actividad enzimática de PL de las LEV del grupo 5. Cada color representa un grupo homogéneo (fuente: esta investigación).

De acuerdo con los resultados de actividad enzimática de PME y PL, y el crecimiento en pectina a 1%, los 14 aislados de LEV del grupo A (figura 2) cumplieron con todos los criterios establecidos para la conformación del cultivo iniciador. De tal manera, con la información adicional sobre la caracterización molecular, la selección se realizó con base en este grupo según lo descrito en el epígrafe 7.9.

8.1.2.2 Bacterias ácido lácticas.

Las BAL se clasificaron como homofermentativas o heterofermentativas según la producción de CO₂, tal como se presenta en la Tabla 7.

Tabla 7. Tipo de metabolismo de las BAL según la producción de CO₂.

BAL	Producción de CO ₂	Tipo de metabolismo
BL01	-	Homofermentativo
BL02	+	Heterofermentativo
BL03	-	Homofermentativo
BL04	-	Homofermentativo
BL05	-	Homofermentativo
BL06	+	Heterofermentativo
BL07	-	Homofermentativo
BL08	-	Homofermentativo
BL09	+	Heterofermentativo
BL10	-	Homofermentativo
BL11	+	Heterofermentativo
BL12	+	Heterofermentativo
BL13	-	Homofermentativo
BL14	+	Heterofermentativo
BL15	-	Homofermentativo
BL16	-	Homofermentativo
BL17	+	Heterofermentativo
BL18	-	Homofermentativo
BL19	+	Heterofermentativo
BL20	+	Heterofermentativo
BL21	-	Homofermentativo
BL22	-	Homofermentativo
BL23	+	Heterofermentativo

De los 23 aislados de BAL, sólo 10 se clasificaron como heterofermentativas al presentar la capacidad de producir CO₂ en la base de los tubos (Figura 3). Para estos 10 aislados se evaluó la producción de ácido láctico bajo una prueba de Kruskal Wallis, la cual, registró un p-valor de 3.349×10^{-9} que comprobó la existencia de diferencias estadísticamente significativas entre la producción de ácido láctico de las BAL heterofermentativas. Adicionalmente, con el Test de Duncan se encontraron dos grupos homogéneos: el grupo A conformado por los aislados con la mayor producción de ácido láctico con un rango de 354.46 hasta 367.22 g.L⁻¹, y por otro lado, el grupo B con los aislados que presentaron la menor producción de ácido láctico con un rango de 219.96 hasta 234.18 g.L⁻¹ (Figura 4).

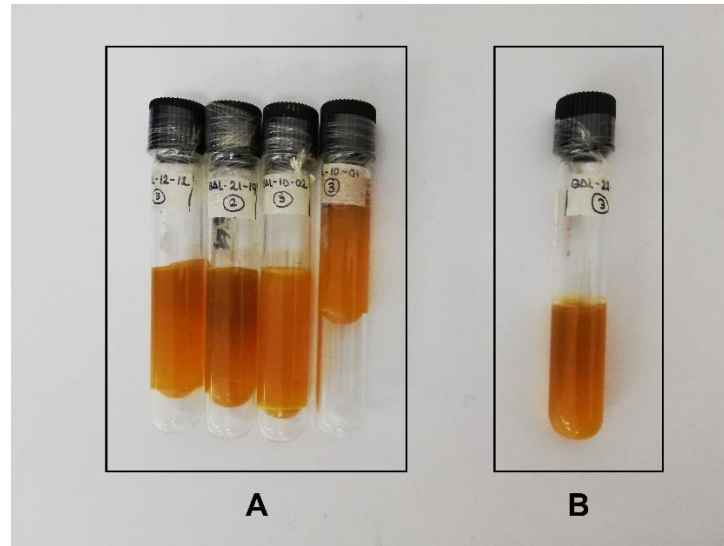


Figura 3. Producción de CO₂ por parte de las BAL. A) Aislados con metabolismo heterofermentativo, B) Aislado con metabolismo homofermentativo (fuente: esta investigación).

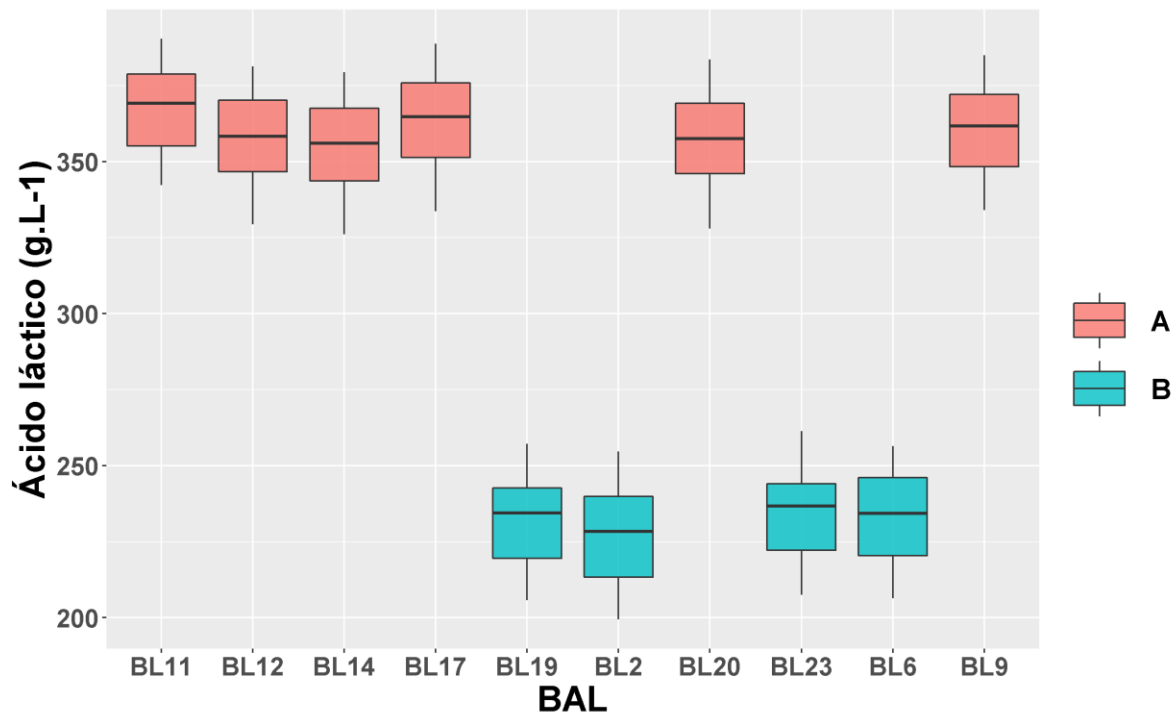


Figura 4. Producción de ácido láctico de las BAL heterofermentativas. Cada color representa un grupo homogéneo (fuente: esta investigación).

Con las BAL del grupo B se evaluó el crecimiento en el medio con mucílago de cacao. En este ensayo, según la prueba de Kruskal Wallis que registró p-valor de 0.193, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas con respecto a la media de los datos de crecimiento de cada aislado, lo cual mantiene relación con las medidas celulares registradas a las 48 h de la fase estacionaria que oscilaron en un rango de 1.86×10^9 hasta $2,25 \times 10^9$ células.mL⁻¹ (Figura 5).

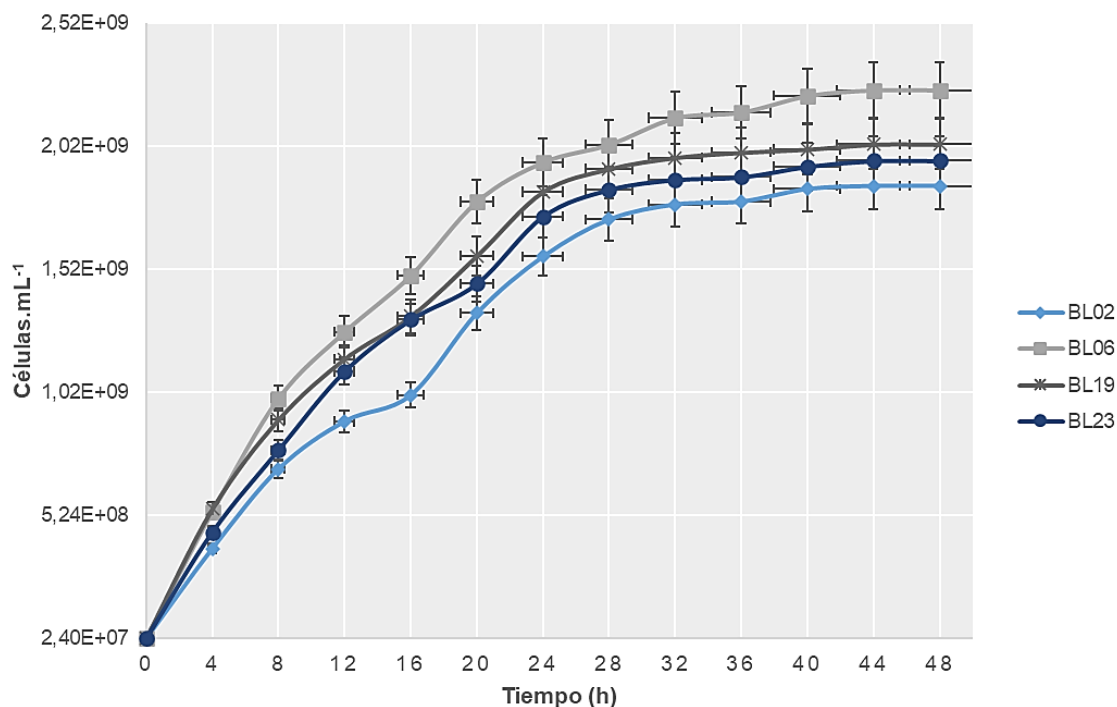


Figura 5. Curvas de crecimiento de las BAL heterofermentativas del grupo B. Las barras representan la desviación estándar (fuente: esta investigación).

Teniendo en cuenta estos resultados, los 4 aislados del grupo B (figura 4 y 5) cumplieron con los criterios establecidos para la conformación del cultivo iniciador, presentando un metabolismo heterofermentativo y una baja producción de ácido láctico. En tal sentido, la selección se realizó con base en este grupo una vez finalizada la caracterización molecular.

8.1.2.3 Bacterias ácido acéticas.

Todos los aislados de BAA presentaron la capacidad de oxidar acetato en todas las concentraciones establecidas. Sin embargo, con el lactato los resultados fueron cambiando dependiendo de la concentración: 25 aislados presentaron capacidad oxidativa a una concentración de 1%, 23 aislados a una concentración de 2 % y sólo 10 aislados presentaron una respuesta positiva con una concentración de 3 % (Tabla 8).

Tabla 8. Capacidad de BAA para oxidar lactato a diferentes concentraciones.

BAA	Oxidación de lactato [1%]	Oxidación de lactato [2%]	Oxidación de lactato [3%]
BA01	+	+	-
BA02	+	+	+
BA03	+	+	-
BA04	+	+	-
BA05	+	+	-
BA06	+	+	-
BA07	+	+	-
BA08	+	-	-
BA09	+	+	-
BA10	+	+	+
BA11	+	+	+
BA12	+	+	+
BA13	+	+	+
BA14	+	+	+
BA15	+	+	+
BA16	+	+	-
BA17	+	+	+
BA18	+	+	+
BA19	+	+	+
BA20	+	+	-
BA21	+	+	-
BA22	+	+	-
BA23	+	-	-
BA24	-	-	-
BA25	+	+	-
BA26	+	+	-

Entre las BAA con capacidad para de oxidar lactato a 3%, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los valores de producción de ácido acético (p-valor = 0.991). De tal forma, los 10 asilados se ubicaron en un sólo grupo homogéneo y se registró una producción de ácido acético que osciló en un rango 3.23 y 5.28 g.L⁻¹ (Figura 6).

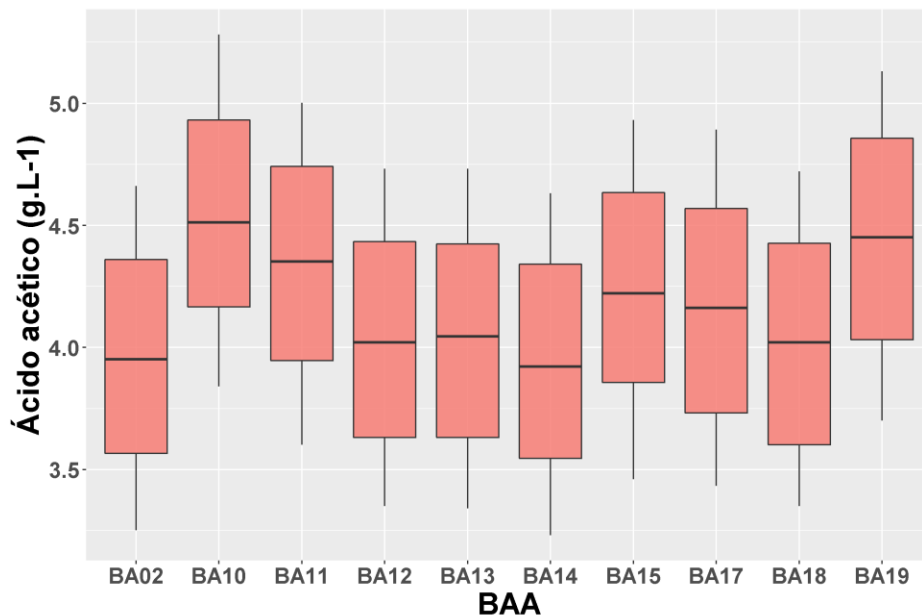


Figura 6. Producción de ácido acético de las BAA con capacidad de oxidar lactato y acetato a una concentración del 3%. (fuente: esta investigación).

Debido a la ausencia de diferencias significativas entre la producción de ácido acético, se evaluó el crecimiento de estos 10 aislados en el medio con mucílago de cacao. Para este caso, según la prueba de Kruskal Wallis, sí se encontraron diferencias estadísticamente con respecto al crecimiento de los aislados ($p\text{-valor} = 1.06 \times 10^{-8}$). De tal manera, al realizar el Test de Duncan se identificaron 3 grupos homogéneos: el grupo A que presenta el mayor crecimiento a las 48 h con un rango de 2.32×10^9 hasta 2.5×10^9 células.mL⁻¹, el grupo B con un rango de 1.54×10^9 hasta 1.73×10^9 células.mL⁻¹ y por último, el grupo C que presenta el menor crecimiento con un rango de 1.09×10^9 hasta 1.36×10^9 células.mL⁻¹ (Figura 7).

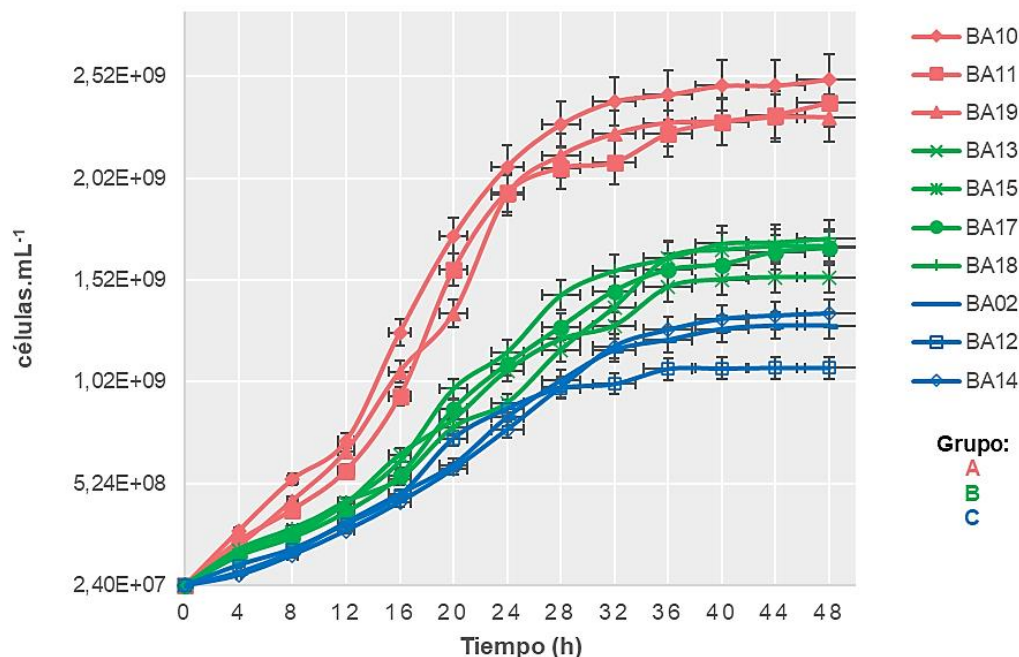


Figura 7. Curvas de crecimiento de las BAA con capacidad de oxidar lactato y acetato a una concentración del 3%. Las barras representan la desviación estándar (fuente: esta investigación).

Acorde a los criterios de selección establecidos para la conformación del cultivo iniciador, las BAA del grupo A cumplieron con la mayoría de estas características al presentar la capacidad de oxidar acetato y lactato a una concentración de 3 % y al registrar los mayores valores de crecimiento. En tal sentido, la selección se realizó con base en este grupo una vez finalizada la caracterización molecular.

8.2 Caracterización molecular de los microorganismos seleccionados para la formación del cultivo iniciador

8.2.1 Levaduras

Sobre la extracción de ADN de las LEV que registraron la mayor actividad enzimática de PME y el mayor crecimiento en pectina a 1%, en la visualización por electroforesis todas las muestras presentaron un tamaño superior a 20000 pb y una concentración de 80 ng.μL⁻¹ según la escalera *Thermo Scientific™ GeneRuler 1 kb Plus DNA Ladder* (Figura 8). Por tanto, todas las muestras de ADN se consideraron con la calidad y concentración necesaria para continuar con los procesos de amplificación de las regiones ITS1-5.8S ARNr-ITS2 y el dominio D1/D2 ARNr (26S).

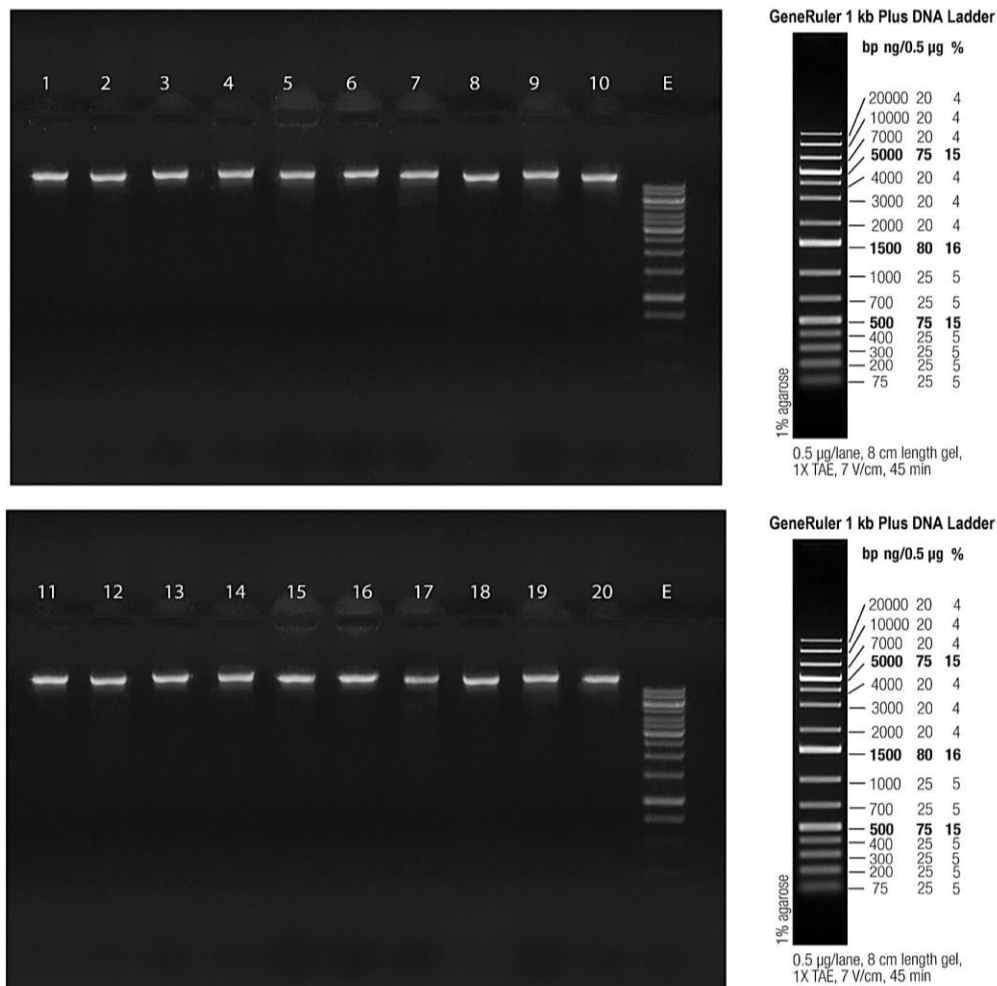


Figura 8. Visualización de las muestras de ADN de los aislados de LEV en gel de agarosa a 1%. Muestras de ADN correspondientes de 1 a 20: L09, L10, L20, L27, L28, L32, L33, L34, L35, L36, L37, L44, L51, L58, L64, L67, L68, L69, L73, L79; E: escalera *Thermo Scientific™ GeneRuler 1 kb Plus DNA Ladder*. (fuente: esta investigación).

De acuerdo con la PCR de la región ITS1-5.8S ARNr-ITS2, el tamaño aproximado de los amplicones fue de 1000 pb con una concentración de $80 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ en comparación con la escalera *Thermo Scientific™ GeneRuler 100 bp Plus DNA Ladder* (Figura 9). Por otro lado, a partir de la secuenciación *Sanger* y la eliminación de las regiones con baja calidad se determinó de forma más precisa el tamaño de las secuencias; las cuales, al ser comparadas con las secuencias disponibles en la base de datos del *GenBank*, permitieron la identificación de las siguientes especies: 11 aislados de *Saccharomyces cerevisiae* con porcentajes de identidad entre 97.32 y 100 %, 3 aislados de *Pichia kudriavzevii* entre 99.57 y 99.78 %, 4 aislados de *Candida glabrata* entre 99.76 y 100 % y 2 aislados de *Candida tropicalis* con 100 % para cada uno (Tabla 9). Además, se registró un valor E de 0.0 para todos los casos, lo cual representa una elevada significancia

estadística de las coincidencias nucleotídicas en el análisis por BLAST. No obstante, algunos aislados presentaron bajos porcentajes de cobertura de alineamiento con respecto a las secuencias de referencia, en particular, *P. kudriavzevii* L64, *C. glabrata* L69 y *S. cerevisiae* L73 poseen las coberturas de alineamiento más bajas con 43, 67 y 69 %, respectivamente. Esto se relaciona con el tamaño de las secuencias de referencia, debido a que estas tienen una menor longitud de pb (MW621910.1: 481 pb; KP780450.1: 866 pb; KC544490.1: 817 pb) en comparación con las secuencias de las LEV mencionadas.

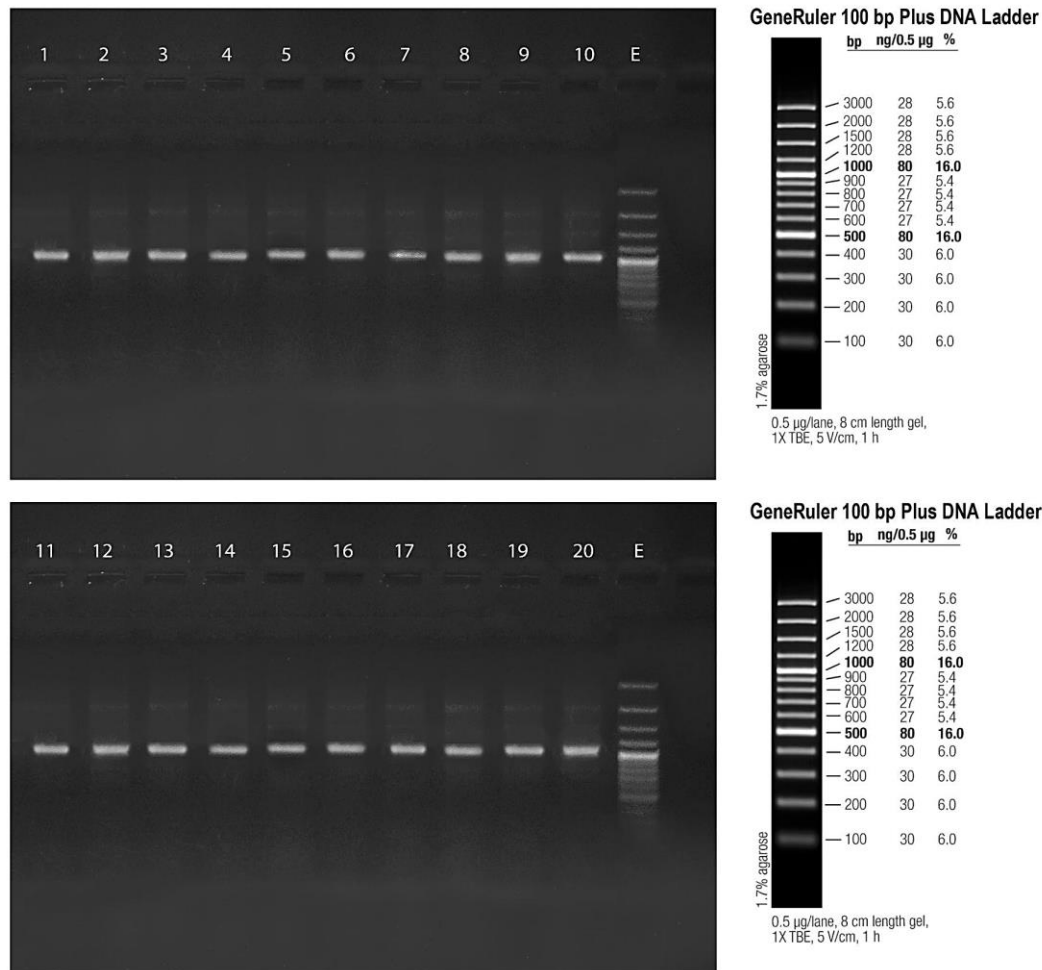


Figura 9. Visualización de los amplicones de la región ITS1-5.8S ARNr-ITS2 de LEV en gel de agarosa a 1%. Amplicones correspondientes del 1 al 20: L09, L10, L20, L27, L28, L32, L33, L34, L35, L36, L37, L44, L51, L58, L64, L67, L68, L69, L73, L79; E: escalera Thermo Scientific™ GeneRuler 100 bp Plus DNA Ladder. (fuente: esta investigación).

Tabla 9. Identificación molecular de las LEV de acuerdo con la región ITS1-5.8S ARNr-ITS2.

Cód. LEV	Nombre científico	Tamaño secuencia	Puntaje máximo	% Cobertura alineamiento	% Identidad	Ref GenBank	Código de acceso GenBank
L09	<i>C. glabrata</i>	1058	1797	96%	100.00%	KX450858.1	ON112282
L10	<i>C. tropicalis</i>	1035	1547	92%	100.00%	KU962005.1	ON262405
L20	<i>S. cerevisiae</i>	1048	1347	74%	97.82%	MN796513.1	ON262406
L27	<i>C. tropicalis</i>	1016	1411	94%	100.00%	KP131819.1	ON262407
L28	<i>C. glabrata</i>	1057	1531	78%	100.00%	MF187258.1	ON262408
L32	<i>S. cerevisiae</i>	1040	1712	94%	98.97%	KP204935.1	ON262409
L33	<i>S. cerevisiae</i>	1057	1384	73%	98.97%	KP204935.1	ON262410
L34	<i>S. cerevisiae</i>	799	1443	97%	100.00%	MF944081.1	ON262411
L35	<i>S. cerevisiae</i>	1006	1434	77%	99.87%	MF944081.1	ON262412
L36	<i>S. cerevisiae</i>	1021	1723	96%	100.00%	KF728774.1	ON262413
L37	<i>C. glabrata</i>	1009	1782	97%	100.00%	KX450858.1	ON262414
L44	<i>S. cerevisiae</i>	1026	1441	76%	100.00%	KC544501.1	ON262415
L51	<i>P. kudriavzevii</i>	461	841	99%	99.57%	MW621910.1	ON262416
L58	<i>S. cerevisiae</i>	1017	1715	94%	100.00%	MG734857.1	ON262417
L64	<i>P. kudriavzevii</i>	1024	826	43%	99.78%	MW621910.1	ON262418
L67	<i>S. cerevisiae</i>	999	1684	95%	100.00%	MF944081.1	ON262419
L68	<i>P. kudriavzevii</i>	1002	1287	95%	99.78%	MK748988.1	ON262420
L69	<i>C. glabrata</i>	1225	1513	67%	99.76%	KP780450.1	ON262421
L73	<i>S. cerevisiae</i>	1116	1328	69%	97.32%	KC544490.1	ON262422
L79	<i>S. cerevisiae</i>	1017	1428	76%	100.00%	MG734853.1	ON262423

*Valor E: 0.0 para todas las secuencias

De esta manera, la identificación molecular de las LEV se confirmó con la PCR del dominio D1/D2 ARNr (26S). Para esta región, los amplicones presentaron una longitud aproximada de 600 pb con una concentración de 80 ng.μL⁻¹ en comparación con la escalera *Thermo Scientific™ GeneRuler 100 bp Plus DNA Ladder* (Figura 10). Con respecto al proceso de identificación, los aislados se clasificaron de igual forma dentro de las especies registradas anteriormente y la homología con las secuencias disponibles en la base de datos del *GenBank* estuvo representada con los siguientes porcentajes de identidad: 11 aislados de *Saccharomyces cerevisiae* entre 97.57 y 100 %, 3 aislados de *Pichia kudriavzevii* entre 98.57 y 100 %, 4 aislados de *Candida glabrata* entre 98.43 y 99.82 %, y 2 aislados de *Candida tropicalis* con 97.00 y 99.28 %. Asimismo, el valor E fue de 0.0 para todos los casos y, a diferencia de la región ITS1-5.8S ARNr-ITS2, los porcentajes de cobertura de alineamiento para el dominio D1/D2 ARNr (26S) estuvieron por encima del 97 %, corroborando de una mejor forma las coincidencias nucleotídicas con las secuencias de referencia en el análisis por BLAST (Tabla 10).

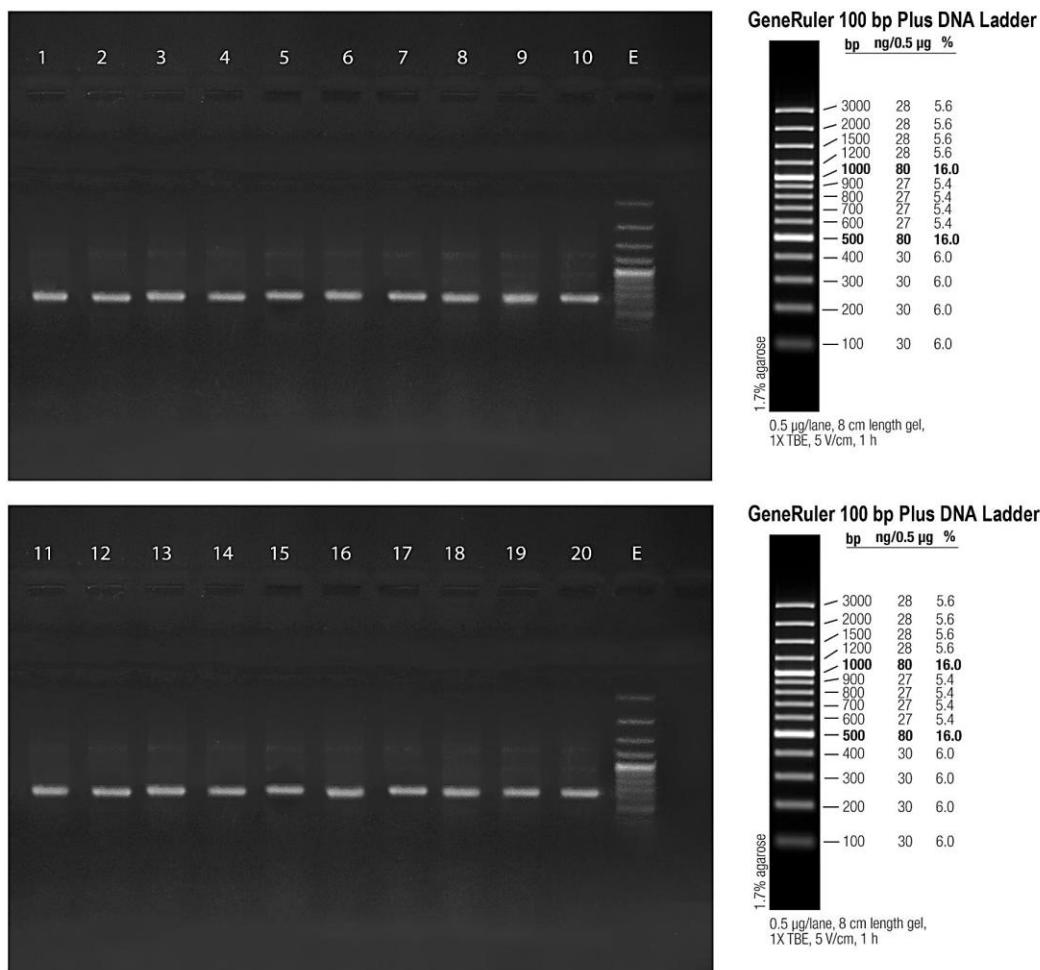


Figura 10. Visualización de los amplicones del dominio D1/D2 ARNr (26S) de LEV en gel de agarosa a 1%. Amplicones correspondientes del 1 al 20: L09, L10, L20, L27, L28, L32, L33, L34, L35, L36, L37, L44, L51, L58, L64, L67, L68, L69, L73, L79; E: escalera *Thermo Scientific™ GeneRuler 100 bp Plus DNA Ladder*. (fuente: esta investigación).

Tabla 10. Identificación molecular de LEV aisladas de cacao de acuerdo con el dominio D1/D2 ARNr (26S).

Cód. LEV	Nombre científico	Tamaño secuencia	Puntaje máximo	% Cobertura alineamiento	% Identidad	Ref GenBank	Código de acceso GenBank
L09	<i>C. glabrata</i>	570	1029	98%	99.82%	MW349784.1	ON239710
L10	<i>C. tropicalis</i>	552	994	100%	99.28%	KJ794665.1	ON239711
L20	<i>S. cerevisiae</i>	559	1011	99%	99.64%	JQ824869.1	ON239712
L27	<i>C. tropicalis</i>	567	939	100%	97.00%	KJ794662.1	ON239713
L28	<i>C. glabrata</i>	563	1014	100%	99.29%	MH481612.1	ON239714
L32	<i>S. cerevisiae</i>	567	1042	99%	100.00%	MK908002.1	ON239715
L33	<i>S. cerevisiae</i>	564	992	99%	98.75%	JX129896.1	ON239716
L34	<i>S. cerevisiae</i>	566	983	98%	98.57%	JQ824869.1	ON239717
L35	<i>S. cerevisiae</i>	571	987	99%	98.24%	MG017586.1	ON239718
L36	<i>S. cerevisiae</i>	559	1000	100%	99.11%	MG017586.1	ON239719
L37	<i>C. glabrata</i>	586	1026	95%	99.64%	MZ055423.1	ON239720
L44	<i>S. cerevisiae</i>	565	1014	98%	99.46%	KT945088.1	ON239721
L51	<i>P. kudriavzevii</i>	550	1016	100%	100.00%	MN648835.1	ON239722
L58	<i>S. cerevisiae</i>	563	1014	98%	99.64%	JQ824869.1	ON239723
L64	<i>P. kudriavzevii</i>	557	1002	98%	99.64%	KX197411.1	ON239724
L67	<i>S. cerevisiae</i>	551	1011	100%	99.82%	LC336450.1	ON239725
L68	<i>P. kudriavzevii</i>	556	979	100%	98.57%	KY108834.1	ON239726
L69	<i>C. glabrata</i>	591	1002	97%	98.43%	KF214417.1	ON239727
L73	<i>S. cerevisiae</i>	594	976	97%	97.57%	JX129896.1	ON239728
L79	<i>S. cerevisiae</i>	567	985	98%	98.57%	JQ824869.1	ON239729

*Valor E: 0.0 para todas las secuencias

Estos resultados se relacionan con los análisis de distancias por *Neighbor-joining* tanto de la región ITS1-5.8S ARNr-ITS2 como del dominio D1/D2 ARNr (26S), ya que los árboles para ambos casos presentan 4 clados conformados por los aislados correspondientes a cada una de las especies identificadas y soportados con valores bootstrap superiores a 84.2. Además, se observó que los aislados de *S. cerevisiae* mantienen una relación más cercana con los aislados de *C. glabrata*, mientras que *C. tropicalis* y *P. kudriavzevii* se ubicaron en clados diferentes. No obstante, es de señalar que las relaciones dentro de los clados presentan una topología diferente al analizar cada región por separado (Figura 11 y 12).

Al respecto, en el árbol de la región ITS1-5.8S ARNr-ITS2, el clado de *S. cerevisiae* presenta tres relaciones bien soportadas por los valores bootstrap y las distancias genéticas, la primera entre L33 - L58 (72.8; 0.030), la segunda entre L35 - L44 (88.6; 0.027) y por último entre L73 - L79 (100; 0.072). Para *C. glabrata* la

relación más cercana se presentó entre L28 - L69 (75.4; 0.069) y para *P. kudriavzevii* entre L64 - L68 (100; 0.091) (Figura 11).

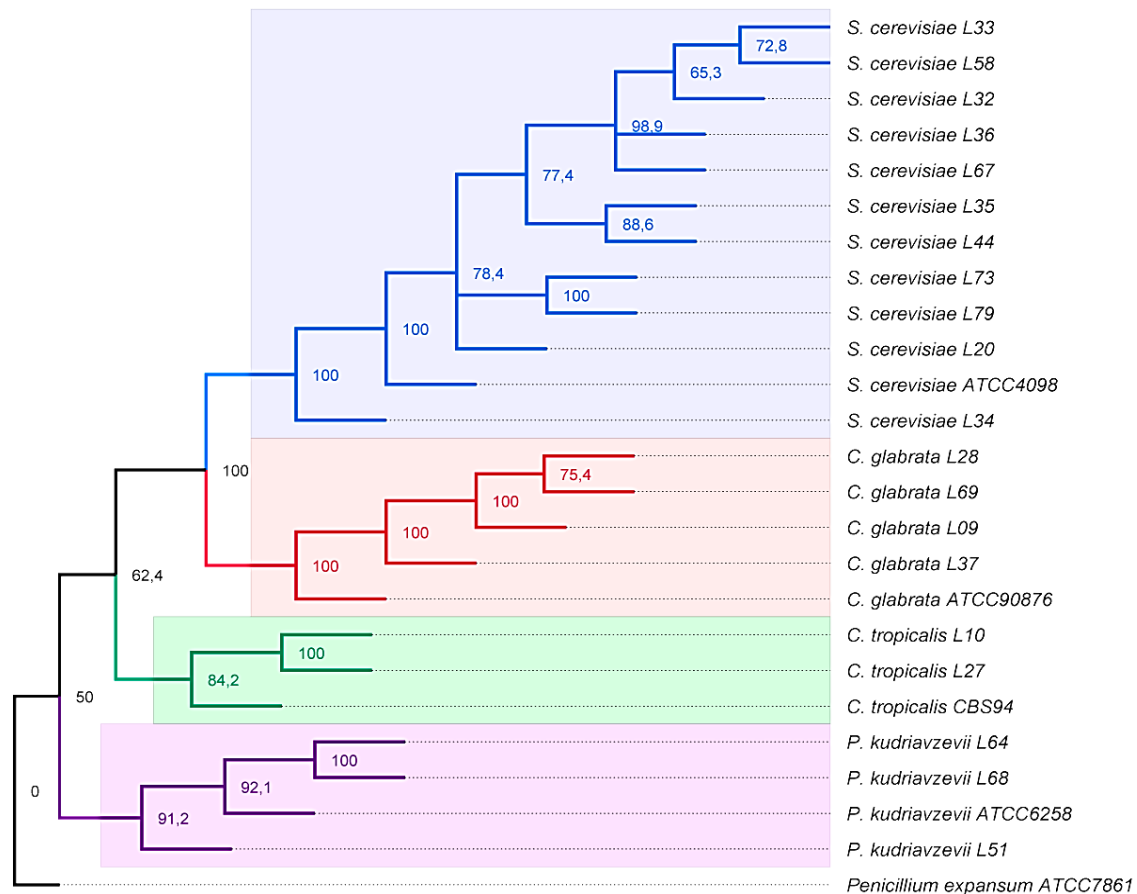


Figura 11. Árbol filogenético construido por Neighbor-joining de las secuencias correspondientes a la región ITS1-5.8S rDNA-ITS2 de las LEV identificadas. Los números en los nodos corresponden a valores bootstrap. (fuente: esta investigación).

Por otro lado, las distancias genéticas dentro de los clados del árbol correspondiente al dominio D1/D2 ARNr (26S) fueron menores con respecto a las cuantificadas para la región ITS1-5.8S ARNr-ITS2; por ejemplo, para *S. cerevisiae* las distancias estuvieron en un rango entre 0.000 y 0.021, para *P. kudriavzevii* entre 0.000 y 0.016, y para *C. glabrata* entre 0.001 y 0.016. Sin embargo, se evidenciaron casos de politomías tanto en *S. cerevisiae* como en *P. kudriavzevii* que dificultaron resolver las relaciones entre los aislados de dichos clados (Figura 12). Sobre el clado de *C. tropicalis*, la relación entre los aislados L10 - L27 estuvo bien soportada tanto para la región ITS1-5.8S ARNr-ITS2 como para D1/D2 ARNr (26S), con valores bootstrap de 100 y 90.2 respectivamente.

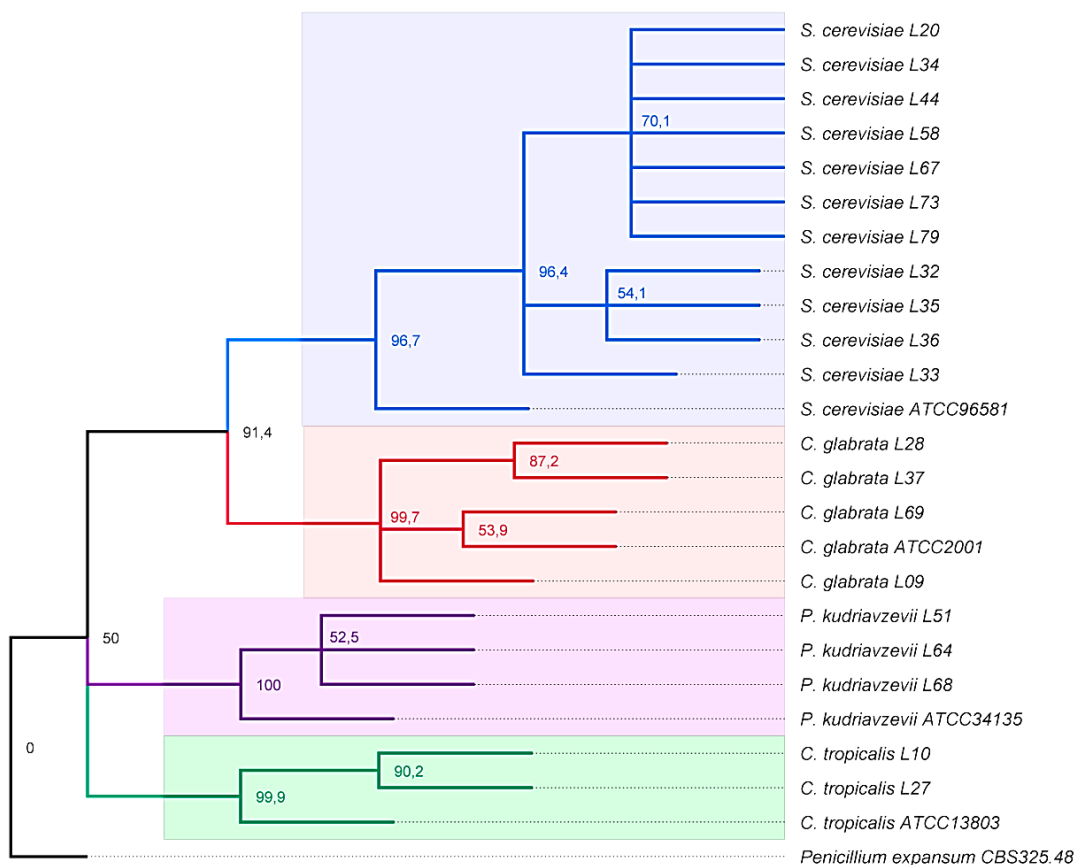


Figura 12. Árbol filogenético construido por *Neighbor-joining* de las secuencias correspondientes al dominio D1/D2 ARNr (26S) de las LEV identificadas. Los números en los nodos corresponden a valores bootstrap (fuente: esta investigación).

8.2.2 Bacterias ácido lácticas y bacterias ácido acéticas

Sobre la extracción de ADN de las BAL heterofermentativas y las BAA con capacidad de oxidar acetato y lactato a 3 %, todas las muestras exhibieron un tamaño superior a 20000 pb y una concentración de 80 ng. μL^{-1} según la escalera *Thermo Scientific™ GeneRuler 1 kb Plus DNA Ladder* (Figura 13). De tal forma, todas las muestras de ADN presentaron la calidad y concentración necesaria para continuar con los procesos de amplificación del gen 16S ARNr.

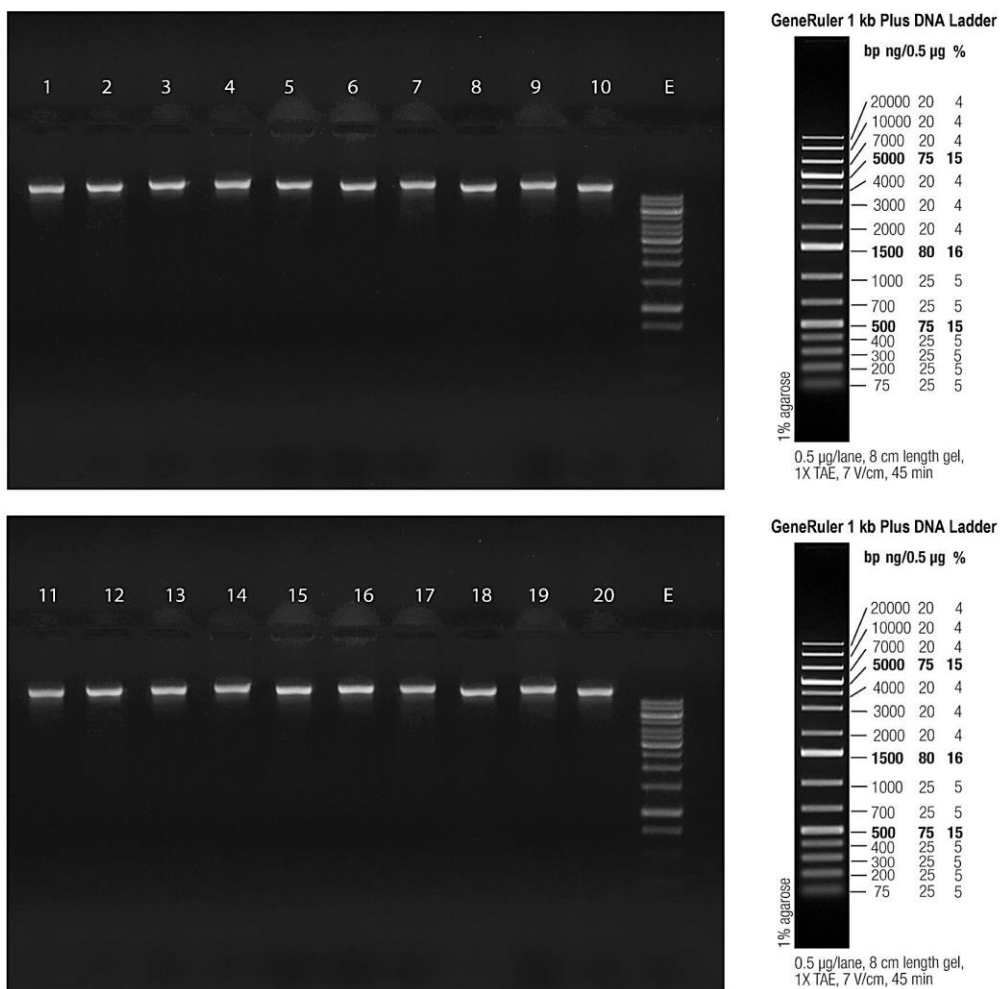


Figura 13. Visualización de las muestras de ADN de los aislados de BAL y BAA en gel de agarosa a 1%. Muestras de ADN correspondientes de 1 a 20: BL02, BL06, BL09, BL11, BL12, BL14, BL17, BL19, BL20, BL23, BA02, BA10, BA11, BA12, BA13, BA14, BA15, BA17, BA18, BA19; E: escalera Thermo Scientific™ GeneRuler 1 kb Plus DNA Ladder (fuente: esta investigación).

En cuanto a la PCR del gen 16S ARNr de BAL y BAA, el tamaño aproximado de los amplicones fue de 1500 pb con una concentración de 80 ng.µL⁻¹ en comparación con la escalera Thermo Scientific™ GeneRuler 100 bp Plus DNA Ladder (Figura 14).

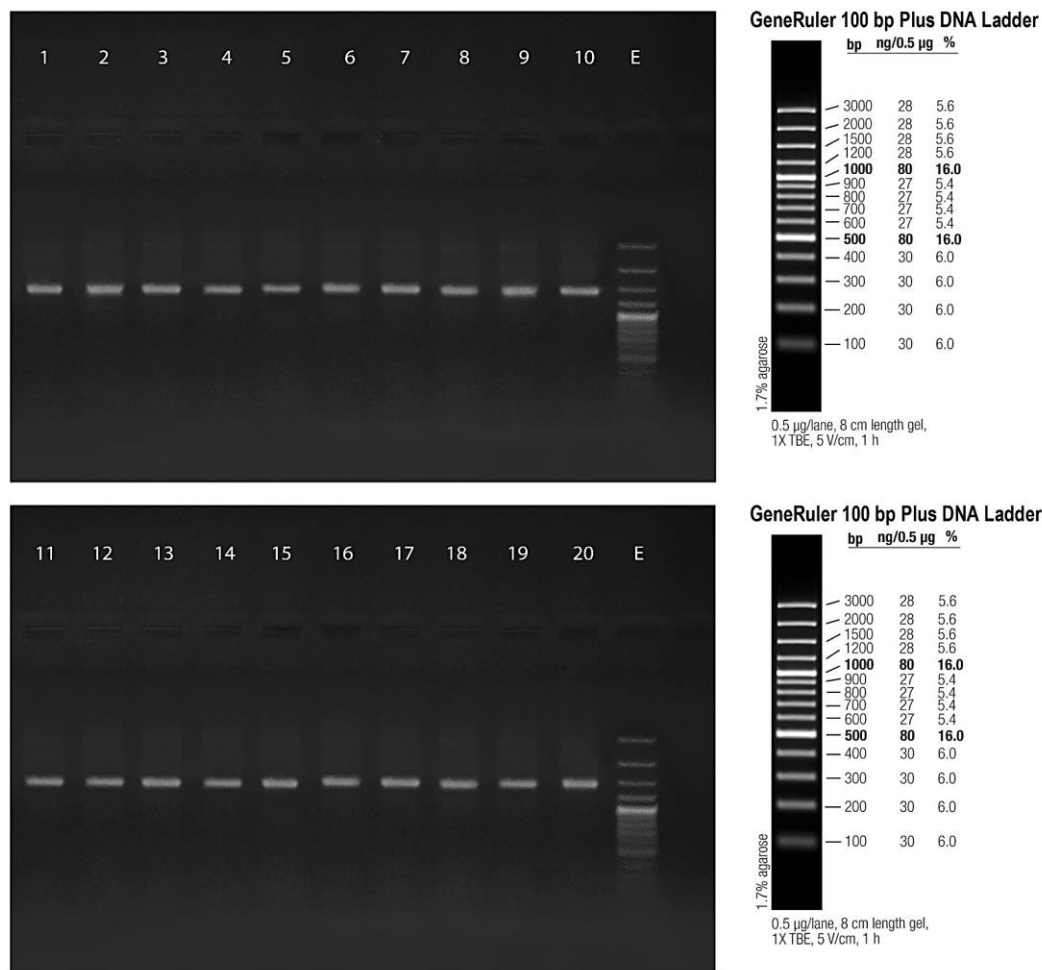


Figura 14. Visualización de los amplicones de la región 16s ARNr de BAL y BAA en gel de agarosa a 1%. Amplicones correspondientes de 1 a 20: BL02, BL06, BL09, BL11, BL12, BL14, BL17, BL19, BL20, BL23, BA02, BA10, BA11, BA12, BA13, BA14, BA15, BA17, BA18, BA19; E: escalera Thermo Scientific™ GeneRuler 100 bp Plus DNA Ladder (fuente: esta investigación).

Por otra parte, al comparar las secuencias obtenidas por el método *Sanger* con las secuencias disponibles en la base de datos del *GenBank*, los aislados de BAL se identificaron de la siguiente forma: 4 aislados de *Levilactobacillus brevis* con porcentajes de identidad entre 97.45 y 99.45 %, y 6 aislados de *Lactiplantibacillus plantarum* entre 95.75 y 99.26 % (Tabla 11); y para BAA: 3 aislados de *Acetobacter fabarum* entre 98.21 y 98.82 %, 3 aislados de *Acetobacter okinawensis* entre 96.89 y 98.83 %, y 4 aislados de *Acetobacter tropicalis* entre 97.68 y 98.65 % (Tabla 12). Además, para todos los aislados bacterianos se registró un valor E de 0.0 y las coberturas de alineamiento fueron iguales o superiores al 90 %, lo cual

demuestra una elevada significancia estadística de coincidencias nucleotídicas con las secuencias de referencia en el análisis por BLAST.

Tabla 11. Identificación molecular de las BAL de acuerdo con la región 16S ARNr

Cód. BAL	Nombre científico	Tamaño secuencia	Puntaje máximo	% Cobertura alineamiento	% Identidad	Ref GenBank	Código de acceso GenBank
BL02	<i>L. brevis</i>	1045	1605	90%	97.45%	MT538890.1	ON245476
BL06	<i>L. brevis</i>	1010	1991	98%	99.45%	MH899279.1	ON245477
BL09	<i>L. plantarum</i>	1092	1943	99%	99.08%	MH899278.1	ON245478
BL11	<i>L. plantarum</i>	1088	1941	98%	99.26%	MH899287.1	ON245479
BL12	<i>L. plantarum</i>	1096	1930	98%	98.89%	MH899278.1	ON245480
BL14	<i>L. plantarum</i>	1096	1930	98%	98.89%	MH899278.1	ON245485
BL17	<i>L. plantarum</i>	1102	1903	98%	98.43%	MH899285.1	ON245481
BL19	<i>L. brevis</i>	1073	1888	99%	98.69%	KJ994382.1	ON245482
BL20	<i>L. plantarum</i>	996	1613	100%	95.75%	MG646872.1	ON245483
BL23	<i>L. brevis</i>	1073	1884	98%	98.77%	KJ994478.1	ON245484

*Valor E: 0.0 para todas las secuencias

Tabla 12. Identificación molecular de las BAA de acuerdo con la región 16S ARNr

Cód. BAA	Nombre científico	Tamaño secuencia	Puntaje máximo	% Cobertura alineamiento	% Identidad	Ref GenBank	Código de acceso GenBank
BA02	<i>A. fabarum</i>	1157	1951	96%	98.21%	MT611597.1	ON239762
BA10	<i>A. okinawensis</i>	1158	1916	96%	97.51%	KX214639.1	ON239763
BA11	<i>A. okinawensis</i>	1135	1873	98%	96.89%	KX214639.1	ON239764
BA12	<i>A. fabarum</i>	1100	1960	100%	98.82%	MT611597.1	ON239765
BA13	<i>A. tropicalis</i>	1098	1954	100%	98.82%	MF191596.1	ON239766
BA14	<i>A. fabarum</i>	1106	1958	99%	98.73%	MT611597.1	ON239767
BA15	<i>A. tropicalis</i>	1113	1973	100%	98.65%	MF191596.1	ON239768
BA17	<i>A. tropicalis</i>	1122	1919	99%	97.68%	MH424822.1	ON239769
BA18	<i>A. tropicalis</i>	1122	1953	100%	98.13%	MH424822.1	ON239770
BA19	<i>A. okinawensis</i>	1109	1973	100%	98.83%	KX214639.1	ON239771

*Valor E: 0.0 para todas las secuencias

Con respecto al árbol filogenético construido para las BAL, se observaron 2 clados que corresponden con las especies identificadas y se encuentran soportados con valores bootstrap de 100 para cada uno. Por un lado, las relaciones entre los aislados del clado de *L. brevis* se lograron resolver y se destaca la cercanía

entre los aislados BL23 - BL19 con una distancia genética de 0.00 y un valor bootstrap de 97.6. De manera similar, dentro del clado de *L. plantarum* no se evidenciaron casos de politomías y se resaltan 2 relaciones: la primera entre los aislados BL09 - BL17 y por otro lado, la relación entre los aislados BL12 - BL14 como un posible estado clonal al presentar una distancia genética de 0.00 y un soporte nodal con un valor bootstrap de 100 (Figura 15).

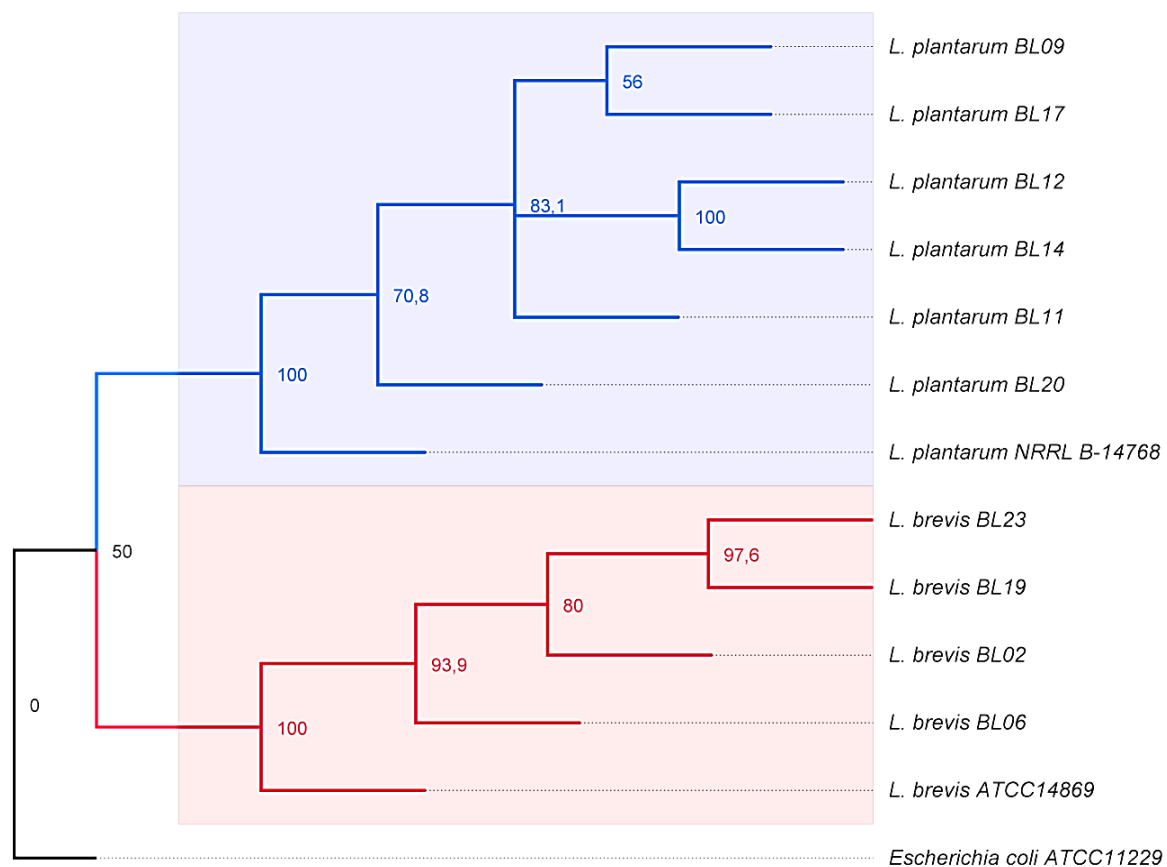


Figura 15. Árbol filogenético construido por *Neighbor-joining* de las secuencias correspondientes a la región 16S ARNr de las BAL identificadas. Los números en los nodos corresponden a valores Bootstrap (fuente: esta investigación).

En el árbol de BAA se estableció con claridad el clado de *A. tropicalis* con un valor bootstrap de 99.3, sin embargo, las relaciones internas entre los aislados no se resolvieron debido a la formación de una politomía. Por otra parte, las posiciones de los aislados de *A. fabarum* y *A. okinawensis* sugieren una relación más cercana entre estas especies, lo cual se corresponde con la estrecha relación entre las raíces internas utilizadas para estos dos grupos, soportada con un valor bootstrap de 99.8 y una distancia genética de 0.006. Específicamente, para *A. fabarum* se destaca la relación entre los aislados BA02 - BA14 (71.6; 0.016); y

con respecto a los aislados de *A. okinawensis*, es evidente la relación entre BA10 - BA19 (80.6; 0.018). Es preciso mencionar que, aunque el aislado BA11 se ubica por fuera del clado, mantiene su relación más cercana con los aislados de *A. okinawensis* al registrar una distancia genética promedio de 0.038, siendo el valor más bajo en comparación con las distancias cuantificadas con respecto a los aislados de *A. fabarum* y *A. tropicalis*, 0.039 y 0.049 respectivamente (Figura 16).

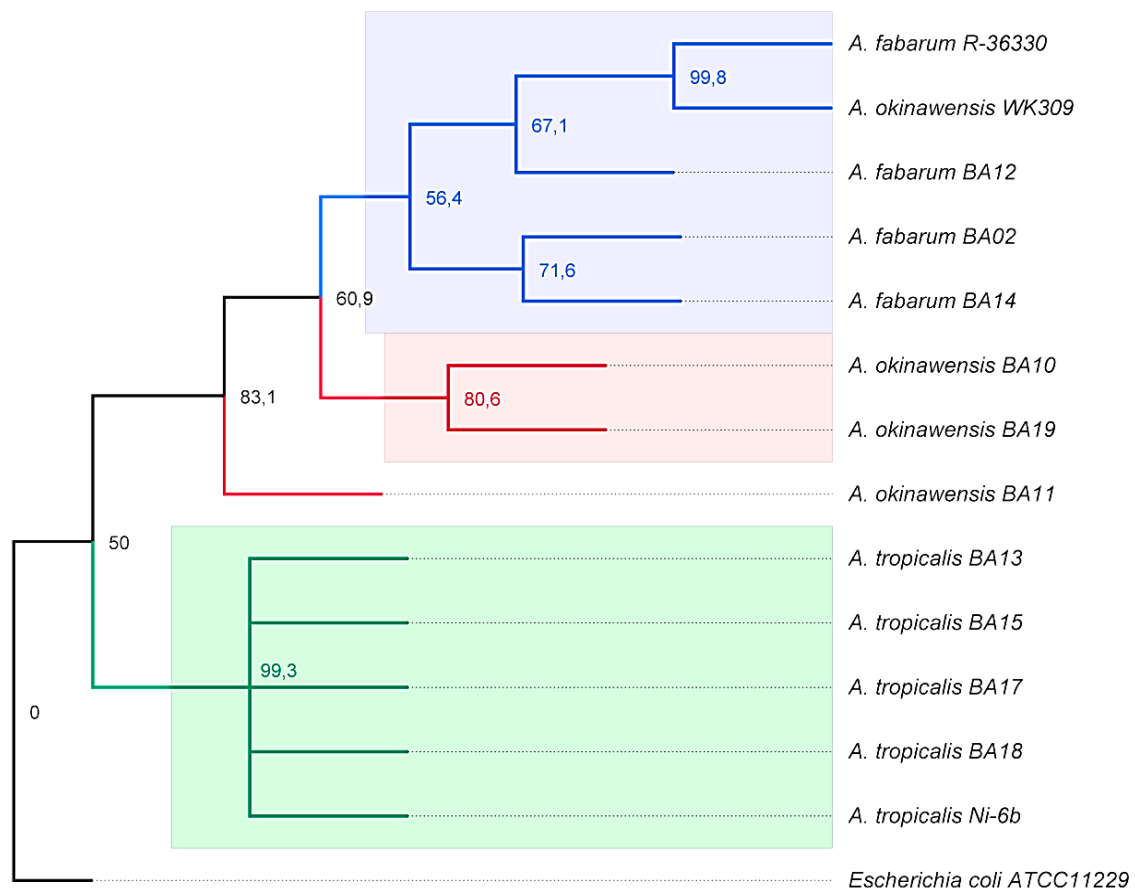


Figura 16. Árbol filogenético construido por *Neighbor-joining* de las secuencias correspondientes a la región 16S ARNr de las BAA identificadas. Los números en los nodos corresponden a valores Bootstrap (fuente: esta investigación).

8.3 Análisis *in-silico* con corte con enzimas de restricción

Teniendo en cuenta los casos de politomías y las relaciones no resueltas en algunos análisis de distancias por *Neighbor-joining*, se realizaron los análisis *in-silico* de RFLP para corroborar las diferencias moleculares entre las especies identificadas y establecer de una mejor forma las relaciones intraespecíficas

de los aislados en cada grupo microbiano. En la tabla 13 se presentan las enzimas seleccionadas y el número de cortes promedio generado por cada una de estas.

Tabla 13. Enzimas de restricción seleccionadas para realizar los ensayos in-silico de RFLP

Grupo microbiano	Numero de secuencias analizadas	Región	Enzimas de restricción	No. Promedio de cortes
LEV	20	ITS1-5.8S ARNr-ITS2	<i>HaeIII</i> - <i>HinfI</i> - <i>HpaII</i> - <i>MseI</i> - <i>TaqI</i>	3 – 3 – 3 – 9 – 4
	20	D1/D2 ARNr (26S)	<i>HaeIII</i> - <i>HhaI</i> - <i>HinfI</i> - <i>RsaI</i> - <i>SetI</i>	3 – 1 – 3 – 3 – 8
BAL	10	16S ARNr	<i>AluI</i> - <i>HaeIII</i> - <i>HinfI</i> - <i>MseI</i> - <i>TaqI</i>	4 – 4 – 2 – 6 – 3
BAA	10	16S ARNr	<i>AluI</i> – <i>HaeIII</i> - <i>HinfI</i> - <i>RsaI</i> - <i>TaqI</i>	6 – 6 – 2 – 3 – 4

De acuerdo con los cortes realizados por las enzimas de restricción en la región ITS1-5.8S ARNr-ITS2 de LEV, se observó que la enzima con el mayor número de cortes promedio fue *MseI* con 9, mientras que las enzimas *HaeIII*, *HinfI* y *HpaII* registraron el menor número promedio con 3 cortes para cada una. Cabe resaltar que todos los aislados de *S. cerevisiae* compartieron ciertos fragmentos formados por las enzimas *MseI* (8, 86, 11, 206 pb), *HaeIII* (172, 311 pb), *HinfI* (382 pb) y *TaqI* (138 pb), planteándose como fragmentos de RFLP exclusivos para estos aislados. De la misma manera, los aislados de *P. kudriavzevii* compartieron determinados fragmentos con respecto a los cortes generados por las enzimas *HaeIII* (38 pb), *HinfI* (137 pb) y *TaqI* (58, 228 pb). Por otro lado, *C. glabrata* y *C. tropicalis* presentaron un menor número de fragmentos similares entre los aislados de la misma especie, donde la enzima *MseI* se destaca por generar fragmentos de 30 pb para todos los aislados de *C. glabrata* y fragmentos de 100 pb para los aislados de *C. tropicalis* (Anexo 1). Según el coeficiente de *Sorensen-Dice*, se tiene que los aislados de *S. cerevisiae* comparten una mayor similitud con los aislados de *P. kudriavzevii* con base en los fragmentos generados por las enzimas de restricción y por su alta producción de enzima PL. De igual manera, *C. glabrata* y *C. tropicalis* se encuentran en un cluster aparte relacionándose entre sí debido a los fragmentos producidos en sus secuencias y a su menor actividad enzimática de PL (Figura 17).

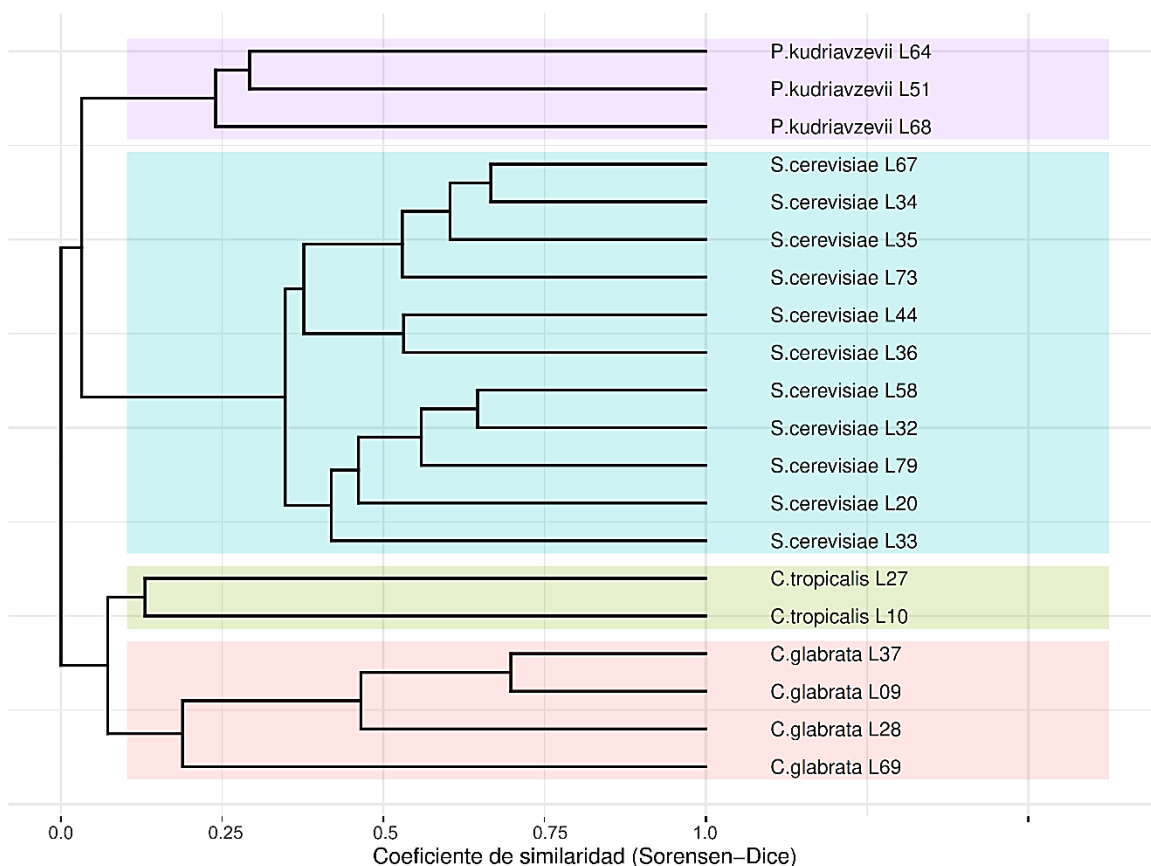


Figura 17. Dendrograma de similitud de las LEV con respecto a las secuencias ITS1-5.8S ARNr-ITS2 mediante el análisis por RFLP. (fuente: esta investigación).

En cuanto a la región D1/D2 ARNr (26S), la enzima que tuvo el mayor número de cortes fue *SetI* con 8, en comparación con la enzima *HhaI* que en promedio tuvo 1 corte por secuencia. Como en el caso anterior, todos los aislados de *S. cerevisiae* compartieron fragmentos exclusivos al ser cortados con las enzimas *HaeIII* (322 pb) y *SetI* (20, 41, 135 pb). Para los aislados de *P. kudriavzevii*, los fragmentos compartidos fueron digeridos por las enzimas *HaeIII* (33 pb), *HhaI* (24, 151 pb), y *SetI* (69, 68, 130 pb). Por su parte, *C. glabrata* presentó fragmentos únicos con las enzimas *HaeIII* (67 pb), *SetI* (39 pb) y *HhaI* (93 pb); y por último, *C. tropicalis* con las enzimas *SetI* (24, 86, 199 pb) y *HhaI* (193 pb). Con respecto al porcentaje de similitud de los fragmentos producidos por las enzimas de restricción, se observó una mayor relación entre *S. cerevisiae* y *C. glabrata*, debido a que los fragmentos formados por las enzimas *MseI* y *HinfI* presentan un patrón de RFLP similar entre los aislados. Por otra parte, los aislados de *P. kudriavzevii* y *C. tropicalis* se encuentran en clados separados (Figura 18). Cabe resaltar que en este análisis por RFLP fue posible resolver los casos de politomías observados en el árbol por *Neighbor-joining* (Figura 12), debido a que las enzimas *HhaI* y *HaeIII* generaron patrones exclusivos entre los aislados de *S. cerevisiae* y entre los aislados de *P. kudriavzevii* (Anexo 2).

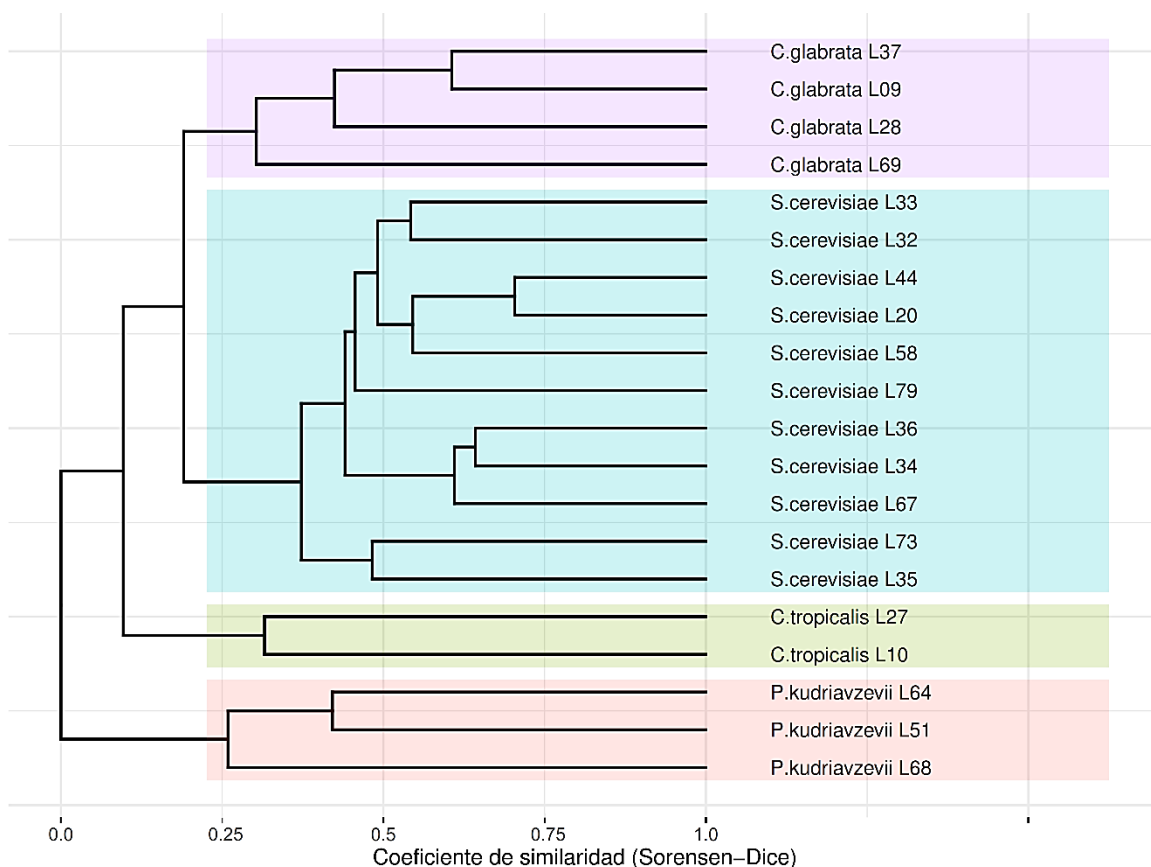


Figura 18. Dendrograma de similitud de las LEV con respecto a las secuencias D1/D2 ARNr (26S) mediante el análisis por RFLP (fuente: esta investigación).

Para la región 16S ARNr de BAL, se observó que la enzima con el mayor número de cortes promedio fue *MseI* con 6, por el contrario, la enzima *HinfI* presentó el menor número promedio con 2 cortes en total. Los aislados de *L. plantarum* presentaron fragmentos únicos al ser cortados con las enzimas *TaqI* (14 pb), *HaeIII* (34, 286, 564 pb), *AluI* (51, 172, 615 pb) y *HinfI* (378). Por otro lado, los aislados de *L. brevis* presentaron fragmentos únicos con respecto a la digestión de las enzimas *MseI* (26 pb), *HaeIII* (414 pb) y *AluI* (816 pb) (Anexo 3). Según el coeficiente de *Sorensen-Dice*, los aislados de *L. brevis* presentan aproximadamente un 25% de similitud con base en los cortes generados por las enzimas de restricción. A su vez, los aislados de *L. plantarum* comparten más de un 20% y se verifica el posible estado clonal entre los aislados BL12 - BL14 que presentaron una similitud del 100 % (Figura 19).

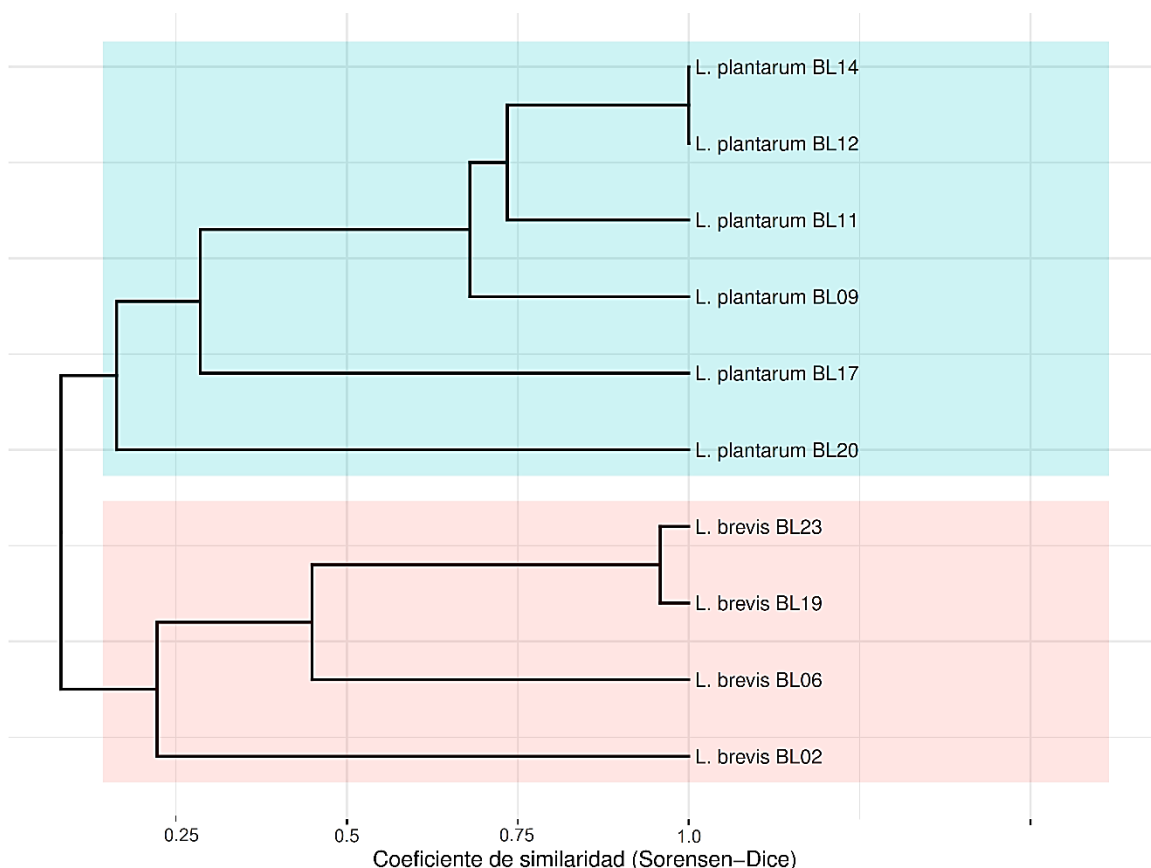


Figura 19. Dendrograma de similitud de las BAL con respecto a las secuencias 16S ARNr mediante el análisis por RFLP. (fuente: esta investigación).

Para la región 16S ARNr de BAA, se observó que las enzimas con el mayor número de cortes promedio fueron *AluI* y *HaeIII* con 6 para cada una, mientras que la enzima *HinfI* presentó el menor número promedio con 2 cortes en total. Los aislados de *A. fabarum* presentaron fragmentos únicos al ser cortados con las enzimas *TaqI* (497 pb), *RsaI* (405 pb), *AluI* (80, 439 pb) y *HinfI* (40 pb). Por otro lado, los aislados de *A. tropicalis* presentaron fragmentos únicos con las enzimas *RsaI* (107 pb), *HaeIII* (7 pb), *HinfI* (30, 75, 122 pb), *AluI* (208, 231 pb) y *TaqI* (653 pb); cabe resaltar que la politomía evidenciada anteriormente en el análisis de distancias (Figura 16), fue resuelta a través de los fragmentos generados por las enzimas *HaeIII* y *AluI* que permitieron diferenciar entre los aislados del cluster (Anexo 4). Por último, *A. okinawensis* no presentó fragmentos exclusivos, lo cual probablemente se relaciona con la dificultad para establecer una correcta relación entre los aislados tal como se evidenció en el análisis de distancias por *Neighbor-joining* (Figura 15). No obstante, según el coeficiente de *Sorensen-Dice*, el cluster de *A. okinawensis* se logró resolver a partir de un 20% de similitud con respecto a los fragmentos de RFLP (Figura 20).

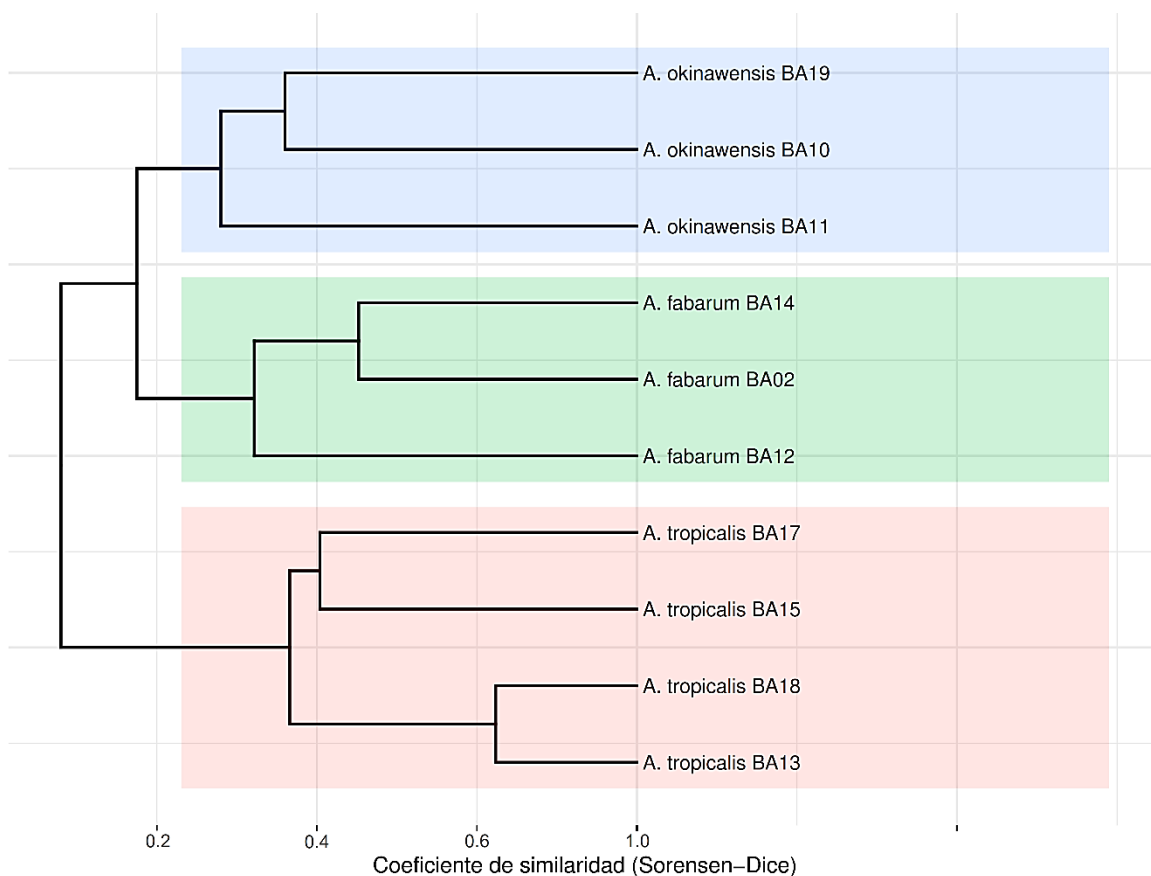


Figura 20. Dendrograma de similitud de las BAA con respecto a las secuencias 16S ARNr mediante el análisis por RFLP. (fuente: esta investigación).

8.4 Desarrollo del cultivo iniciador

Considerando que en el grupo A de LEV se identificaron 2 especies, se seleccionaron los aislados L79 y L51 que corresponden a *S. cerevisiae* y *P. kudriavzevii* respectivamente, éstas fueron escogidas por cuanto presentaron la mayor actividad enzimática de PME y PL, al igual que un mayor crecimiento. Con respecto a las BAL heterofermentativas del grupo B que registraron la menor producción de ácido láctico, se seleccionó el aislado BL06 correspondiente a *L. brevis*, debido a que presentó los valores más altos en crecimiento. Por último, dentro de las BAA se seleccionó el aislado BA10 correspondiente a *A. okinawensis*, bacteria caracterizada por oxidar acetato y lactato a una concentración de 3% y registrar el mayor crecimiento en comparación con los otros aislados.

De acuerdo a estos resultados, los microorganismos seleccionados de cada grupo microbiano (L51, L79, BL06, BA10) se utilizaron para la formación del cultivo iniciador, evaluando su influencia en la dinámica

de ácidos orgánicos no volátiles y compuestos volátiles formados a lo largo de la fermentación para los diferentes tratamientos planteados.

8.5 Determinación de la concentración de ácidos orgánicos no volátiles producidos en los diferentes tratamientos de fermentación mediante HPLC.

En la tabla 14 se presentan los valores promedio de producción de los diferentes ácidos orgánicos para cada uno de los tratamientos experimentales.

Tabla 14. Producción de ácidos orgánicos en tres tratamientos de fermentación de cacao

Tratamiento	Ácido láctico g.kg ⁻¹		Ácido cítrico g.kg ⁻¹		Ácido succínico g.kg ⁻¹		Ácido oxálico g.kg ⁻¹	
	M	± SD	M	± SD	M	± SD	M	± SD
T1 (FN)	3,557 ^b	0.05	1.594 ^a	0.03	0.378 ^{ab}	0.013	0.701 ^a	0.11
T2 (FN + CI)	2,063 ^a	0.2	1,317 ^a	0.01	0.745 ^b	0	0.591 ^a	0.1
T3 (CI)	1.555 ^a	0.03	2,032 ^a	0.2	0.206 ^a	0.015	0.7422 ^a	0.101

M= producción promedio en los 8 días de fermentación y SD= desviación estándar. Los superíndices (a y b) muestran los grupos homogéneos obtenidos en la prueba de Tukey para cada ácido orgánico. T1 (FN): Fermentación bajo condiciones artesanales en el municipio de Los Andes, Sotomayor; T2 (FN + CI): Fermentación bajo condiciones artesanales con cultivo iniciador en el municipio de Los Andes, Sotomayor; T3 (CI): Fermentación con cultivo iniciador bajo condiciones de laboratorio

Mediante una prueba de ANOVA simple se estableció que existen diferencias estadísticamente significativas en la producción de ácido láctico (p-valor = 0.004), y por medio de la prueba Tukey se estableció que el tratamiento T1 presenta la mayor producción de este ácido en comparación con los otros tratamientos que conformaron un grupo homogéneo (Tabla 14). En la Figura 20a se observa la cinética de producción de ácido láctico para todos los tratamientos, en donde la mayor acumulación se registró a las 48 horas para todos los tratamientos con un rango entre 2.40 y 6.42 g.kg⁻¹. Después de este tiempo las concentraciones de ácido láctico disminuyen en todos los casos hasta un rango que oscila entre 0.40 y 3.00 g.kg⁻¹. Cabe resaltar que el T1 siempre registró los valores más altos en todos los tiempos.

En cuanto a la producción de ácido cítrico y ácido oxálico, la prueba de ANOVA simple para cada caso, indicó la ausencia de diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos con un p-valor de 0.21 y 0.09 respectivamente (Tabla 14). Además, el comportamiento de las curvas de acidez siguió una

dinámica similar en los 3 tratamientos, con un decrecimiento a lo largo de los días de fermentación para cada ácido. Para el ácido oxálico, a partir de las concentraciones iniciales que estuvieron entre 0.90 y 1.00 g.kg⁻¹, se registró una disminución hasta valores entre 0.45 y 0.60 g/kg al final de la fermentación (Figura 20b). Sobre el ácido cítrico las concentraciones iniciaron con valores entre 3,40 y 3,67 g.kg⁻¹ y decrecieron hasta valores que oscilaron en un rango de 0.47 y 1.50 g.kg⁻¹ al cabo de las 192 h de fermentación (Figura 21c). Cabe resaltar que al final de la fermentación el mayor consumo para ambos ácidos se registró en el T2.

Por último, sobre la producción de ácido succínico, el análisis de ANOVA simple presentó diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos con un p-valor de 0.008; y según la prueba de Tukey, el T2 presenta los valores más altos de producción y se diferencia significativamente del T3 que presentó los valores más bajos; por su parte, el T1 no se diferencia estadísticamente con ninguno de los tratamientos (Tabla 14). Para el T1 y T3 la mayor producción de este ácido se registró a las 48 h de fermentación con valores de 0.71 y 0.39 g.kg⁻¹ respectivamente, y para el T2 la mayor producción se encuentra a las 120 h con 1.40 g.kg⁻¹. Cabe destacar, que al final de la fermentación fue evidente la disminución de las concentraciones para los tres tratamientos, y específicamente para el T2 se registró el consumo total del ácido (Figura 21d).

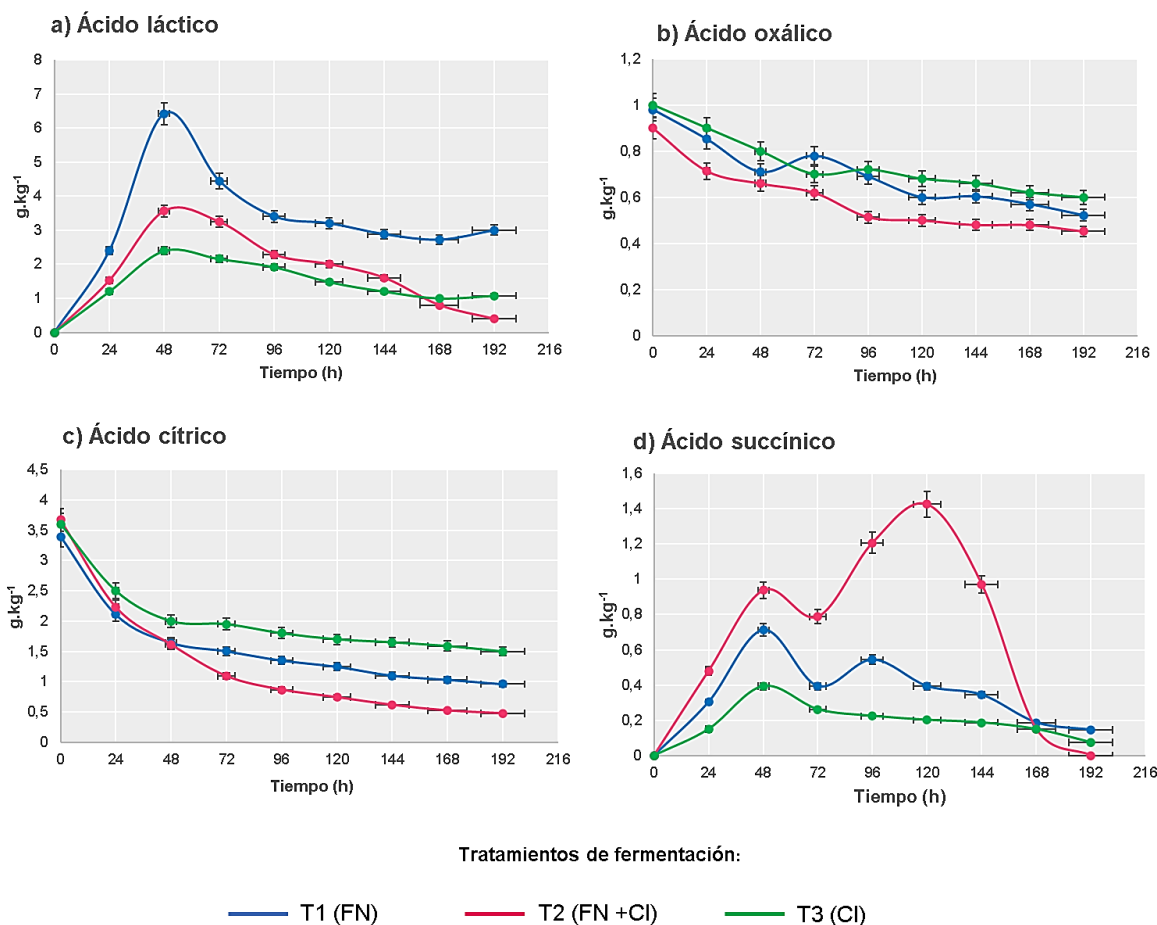


Figura 21. Dinámica de los ácidos orgánicos no volátiles en los diferentes tratamientos de fermentación. a) Ácido láctico; b) Ácido oxálico; c) Ácido cítrico; d) Ácido succínico. Las barras representan la desviación estándar. T1 (FN): Fermentación bajo condiciones artesanales en el municipio de Los Andes, Sotomayor; T2 (FN + CI): Fermentación bajo condiciones artesanales con cultivo iniciador en el municipio de Los Andes, Sotomayor; T3 (CI): Fermentación con cultivo iniciador bajo condiciones de laboratorio (fuente: esta investigación).

8.6 Cuantificación de compuestos volátiles formados en los diferentes tratamientos de fermentación mediante SPME-HS y GC-MS.

En los 3 tratamientos de fermentación evaluados se identificaron un total de 48 compuestos volátiles, clasificados en 6 grupos químicos de la siguiente forma: 20 alcoholes, 9 ésteres, 6 ácidos, 5 cetonas, 4 hidrocarburos y 4 aldehídos. En la Figura 22 se representan los compuestos volátiles identificados en el transcurso de las fermentaciones y se indican los cambios con respecto al perfil cualitativo y cuantitativo de los compuestos según el tratamiento. En resumen, el T1 pasó de presentar 27 compuestos volátiles a un

total de 21 al final de la fermentación, entre los cuales se destaca el aumento en la concentración de ciertos ácidos. Por otra parte, en los tratamientos con cultivo iniciador los mayores cambios se registraron con respecto a las concentraciones de alcoholes, aldehídos y ésteres, en donde el T2 pasó de 32 compuestos iniciales a un total de 31 al final del proceso, y por último, el T3 aumentó el número de compuestos identificados de 16 a 28.

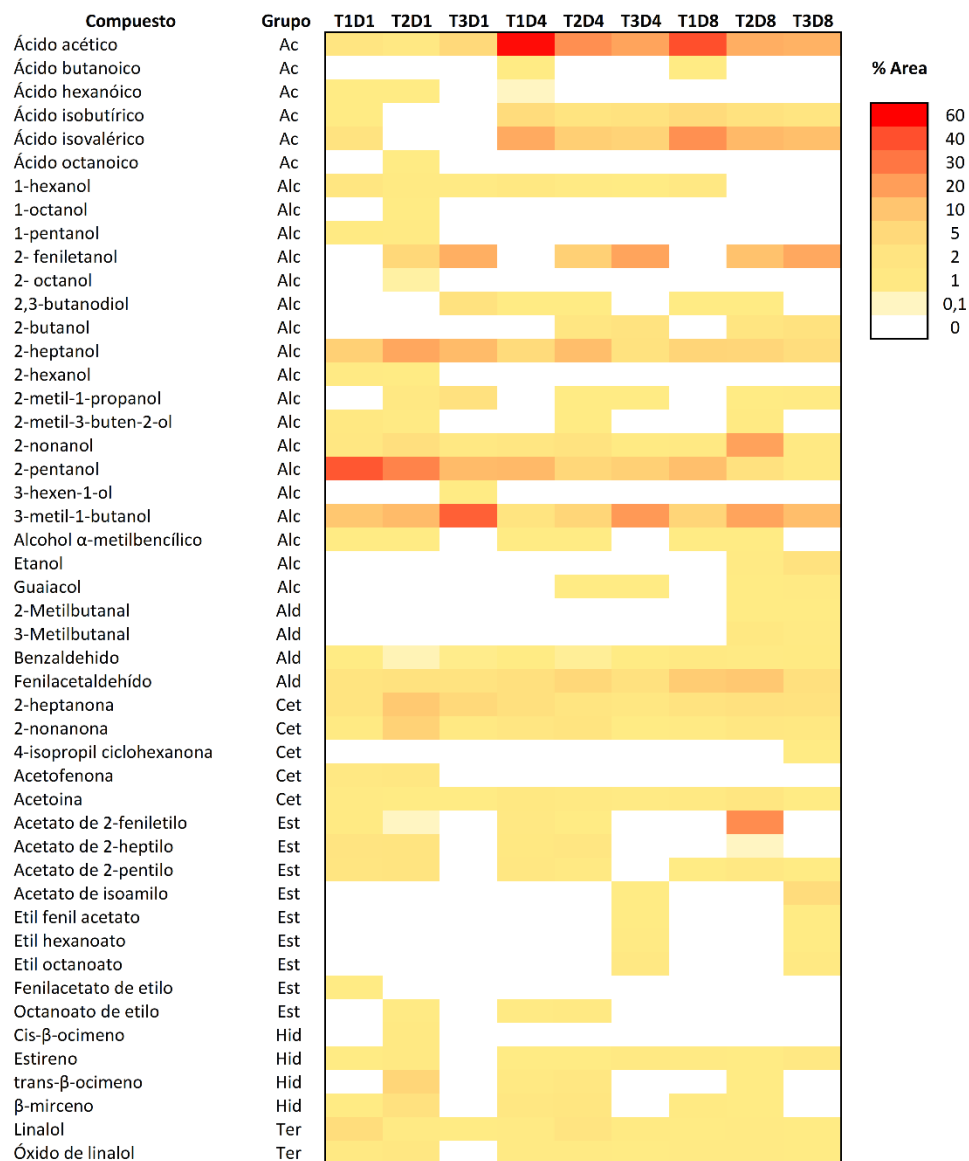


Figura 22. Mapa de calor de los compuestos volátiles identificados en los diferentes tratamientos a lo largo de la fermentación . Grupo químico: **Ac:** ácido; **Alc:** alcohol; **Ald:** aldehído; **Cet:** cetona; **Est:** éster; **Hid:** hidrocarburo; **Ter:** terpeno. **T1-T2-T3:**Tratamientos de fermentación. **D1-D4-D8:** Días de fermentación (fuente: esta investigación).

Lo anterior se relaciona con los ACP, en donde para el día 1 de fermentación se explicó el 96.17 % de la variación de los datos, agrupados en los componentes PC1 (78.06 %) y PC2 (18.10 %). Se observó que el T1 presentó la mayor concentración de 2-pentanol con un porcentaje de área de 37.90 %. Por su parte, el T2 se caracterizó con una mayor cantidad de 2-heptanol (17.70 %) y en el T3 se resalta la concentración de 3-metil-1-butanol (35.60 %). A su vez, el 2-feniletanol sólo se presentó en el T2 y el T3 con porcentajes de área de 5.20 y 15.70 % respectivamente (Figura 23).

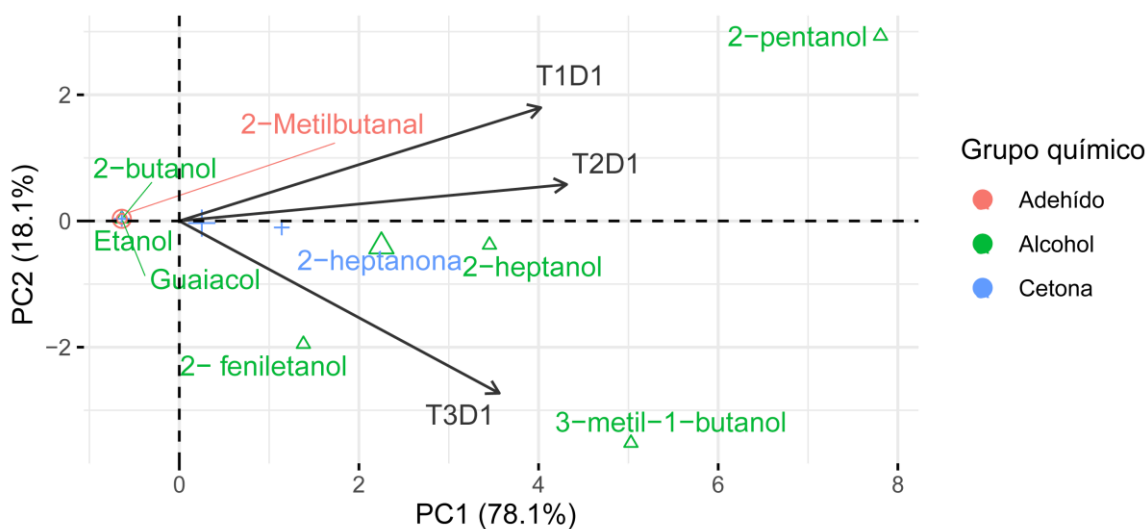


Figura 23. ACP de los compuestos volátiles determinados en los diferentes tratamientos de fermentación de cacao para el día 1. En el análisis solo se indican los compuestos que aportaron con el mayor peso para la construcción de los componentes (fuente: esta investigación).

Para el día 4 de fermentación el ACP explicó el 97 % de la variación de datos, agrupados en los componentes PC1 (82.19 %) y PC2 (14.81 %). En esta fase, en el T1 se observó un incremento en los porcentajes de área de ácido acético (57.10 %), ácido isovalérico (16.90 %), y en una menor medida, ácido isobutírico (4.05 %); además, aunque el 2-pentanol disminuyó hasta un 13.00 % con respecto al día 1 de fermentación, este tratamiento fue el que registró la mayor concentración para este compuesto. En el T2 también hubo un incremento en la concentración de ácido acético (23.70 %) y ácido isovalérico (7.45 %); no obstante, se incrementó la concentración de 2-feniletanol (7.30 %) y fue el tratamiento que registró la mayor cantidad de fenilacetaldéhído (5.25 %) y 2-heptanol (11.85 %). Por el contrario, en el T3 las concentraciones de los ácidos no representaron los mayores porcentajes de área entre los diferentes compuestos y se ubican por debajo de las cantidades reportadas para 3-metil-1-butanol (21.10 %) y 2-feniletanol (18.50 %) (Figura 24).

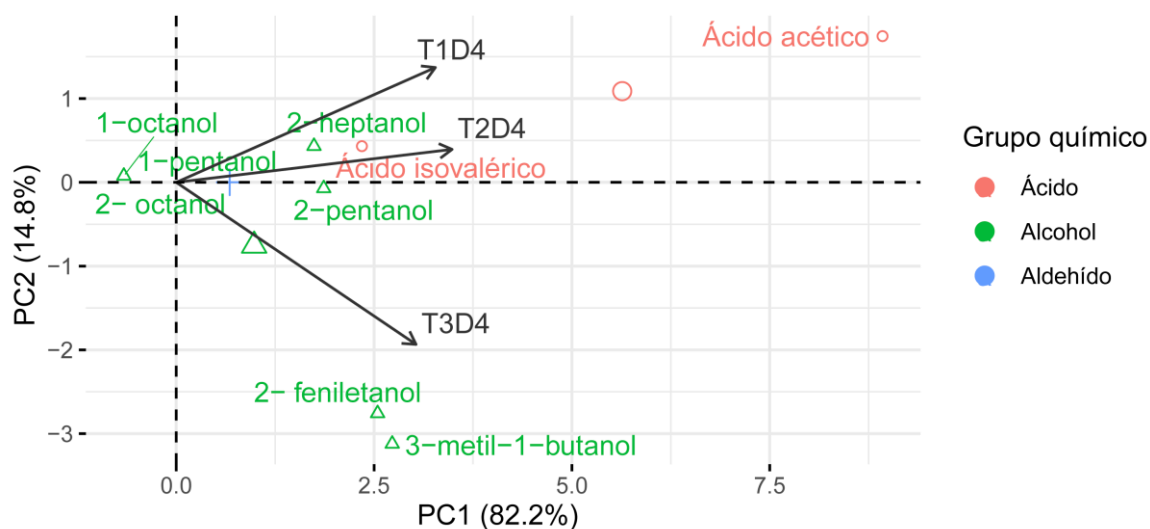


Figura 24. ACP de los compuestos volátiles determinados en los diferentes tratamientos de fermentación de cacao para el día 4. En el análisis solo se indican los compuestos que aportaron con el mayor peso para la construcción de los componentes (fuente: esta investigación).

Por último, para el día 8 de fermentación el ACP explicó el 89,20 % de la variación de datos, agrupados en los componentes PC1 (71.96 %) y PC2 (17.24 %). El T1 presentó un incremento en la concentración de fenilacetaldéhído (8.20 %), sin embargo, prevalecieron las elevadas concentraciones de ácido acético (40.15 %), ácido isovalérico (23.45 %) y 2-pentanol (11.50 %) en comparación con los otros tratamientos. Por otra parte, el T2 se caracterizó por presentar las mayores concentraciones de acetato de 2-feniletilo (24.60 %), 2-nonanol (18.90 %), 3-metil-1-butanol (18.50 %) y fenilacetaldéhído (9.15 %). Por último, el T3 presentó la mayor concentración de 2-feniletanol (17.40 %), y al igual que en el T2, se resalta una disminución en la concentración de ácido acético y 2-pentanol (Figura 25).

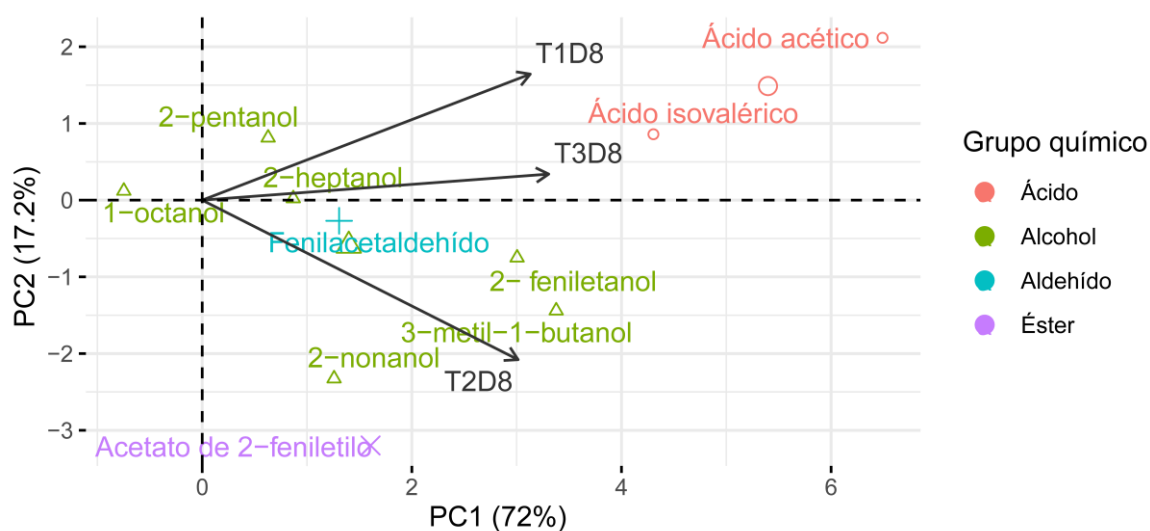


Figura 25. ACP de los compuestos volátiles determinados en los diferentes tratamientos de fermentación de cacao para el día 8. En el análisis solo se indican los compuestos que aportaron con el mayor peso para la construcción de los componentes (fuente: esta investigación).

Sumado a esto es importante mencionar que al final de la fermentación algunos compuestos sólo se identificaron en los tratamientos con cultivo iniciador (T2 y T3), tales como: 2-metil-1-propanol, 2-metilbutanal, 3-metilbutanal y guaiacol. Asimismo, los compuestos acetato de 2-heptilo, 2-metil-3-buten-2-ol y trans β -ocimeno fueron exclusivos para el T2 y los compuestos acetato de isoamilo, 4-isopropil hexanona, etil fenil acetato, etil hexanoato y etil octanoato para el T3. Por último, para determinar el potencial aromático de las semillas de cacao fermentadas, las notas sensoriales que atribuyen los compuestos volátiles se asignaron de acuerdo con la información disponible en la literatura (Tabla 15).

Tabla 15. Compuestos volátiles determinados en los diferentes tratamientos al final de la fermentación

Grupo	Compuesto	% Área $\pm$ desviación estándar (SD)			Nota sabor/aroma
		T1	T2	T3	
Aldehídos	2-Metilbutanal	0	0.43 $\pm$ 0.05	0.25 $\pm$ 0.03	Malta, chocolate ^a
	3-Metilbutanal	0	1.11 $\pm$ 0.6	0.52 $\pm$ 0.07	Malta, chocolate ^a
	Fenilacetaldehído	8.2 $\pm$ 0.3	9.15 $\pm$ 0.4	3.1 $\pm$ 0.2	Amargo, almendra ^a
	Benzaldehído	0.82 $\pm$ 0.05	0.57 $\pm$ 0.12	0.69 $\pm$ 0.3	Miel, dulce, herbáceo ^b

Grupo	Compuesto	% Área $\pm$ desviación estándar (SD)			Nota sabor/aroma
		T1	T2	T3	
Cetonas	2-heptanona	2,4 $\pm$ 0.2	2.75 $\pm$ 0.3	2.65 $\pm$ 0.2	Floral, frutal ^a
	2-nonanona	0.6 $\pm$ 0.4	1.35 $\pm$ 0.05	1.11 $\pm$ 0.07	Herbáceo, afrutado, floral ^a
	4-isopropil Ciclohexanona	0	0	0.3 $\pm$ 0.11	
	Acetofenona	0	0	0	Frutal, herbal, almendra ^a
	Acetoina	0.9 $\pm$ 0.03	1.7 $\pm$ 0.03	0.39 $\pm$ 0.02	Mantequilla, crema ^b
Alcoholes	1-hexanol	1 $\pm$ 0.02	0	0	Pastoso ^a
	1-octanol	0	0	0	Dulce, floral, nuez ^a
	1-pentanol	0	0	0	Dulce ^a
	2- feniletanol	0	10.7 $\pm$ 0.4	17.4 $\pm$ 0.53	Miel, caramelo, floral ^b
	2- octanol	0	0	0	Floral ^c
	2,3-butanodiol	0.35 $\pm$ 0.03	0.25 $\pm$ 0.02	0	Dulce, floral, caramelo ^a
	2-butanol	0	1.9 $\pm$ 0.08	2.7 $\pm$ 0.04	Vino, amargo, herbáceo ^b
	2-heptanol	5.8 $\pm$ 0.3	5,55 $\pm$ 0.6	3.8 $\pm$ 0.5	Dulce, cítrico, limón ^b
	2-hexanol	0	0	0	Frutal, herbáceo ^d
	2-metil-1-propanol	0	0.4 $\pm$ 0.04	0.55 $\pm$ 0.07	Vino ^a
	2-metil-3-buten-2-ol	0	0.7 $\pm$ 0.06	0	Herbal ^a
	2-nonanol	0.85 $\pm$ 0.21	18.9 $\pm$ 0.5	0.8 $\pm$ 0.07	Mantequilla, crema ^a
	2-pentanol	11.5 $\pm$ 0.7	2,8 $\pm$ 0.5	0.88 $\pm$ 0.09	Herbal ^a
	3-hexen-1-ol	0	0	0	Pastoso, herbal ^d
	3-metil-1-butanol	6.05 $\pm$ 0.3	18,5 $\pm$ 0.4	11.76 $\pm$ 0.3	Malta, chocolate ^a
	Alcohol α -metil bencílico	0.25 $\pm$ 0.05	0.2 $\pm$ 0.05	0	Dulce, floral ^a
	Etanol	0	0.53 $\pm$ 0.07	2,71 $\pm$ 0.6	Dulce ^b
	Guaiacol	0	0.35 $\pm$ 0.03	0.5 $\pm$ 0.03	Humo, dulce, picante ^a
Ésteres	Acetato de 2-feniletilo	0	24.6 $\pm$ 0.2	0	Dulce, frutal ^c
	Acetato de 2-heptilo	0	0.1 $\pm$ 0.03	0	Dulce ^a
	Acetato de 2-pentilo	0.3 $\pm$ 0.09	1.1 $\pm$ 0.7	0.36 $\pm$ 0.04	Frutal ^b
	Acetato de isoamilo	0	0	4,1 $\pm$ 0.05	Frutal ^a
	Etil fenil acetato	0	0	0.3 $\pm$ 0.07	Frutal, dulce ^b
	Etil hexanoato	0	0	0.3 $\pm$ 0.09	Piña ^d
	Etil octanoato	0	0	0.8 $\pm$ 0.04	Frutal, floral ^a
	Fenilacetato de etilo	0	0	0	Frutal, dulce, miel ^a
	Octanoato de etilo	0	0	0	Afrutado, floral ^d
	Cis- β -ocimeno	0	0	0	Cítrico, herbal ^e
Hidrocarburos y terpenos	Estireno	0.6 $\pm$ 0.07	0.35 $\pm$ 0.04	1.1 $\pm$ 0.2	
	trans- β -ocimeno	0	0.45 $\pm$ 0.08	0	Dulce, herbal ^e
	β -mirceno	0.7 $\pm$ 0.005	0.4 $\pm$ 0.09	0	
	Linalol	0.3 $\pm$ 0.03	0.5 $\pm$ 0.04	0.4 $\pm$ 0.04	Floral, lavanda ^e
	Óxido de linalol	0.55 $\pm$ 0.05	0.55 $\pm$ 0.01	0.2 $\pm$ 0.09	Cítrico, dulce ^e

Grupo	Compuesto	% Área $\pm$ desviación estándar (SD)			Nota sabor/aroma
		T1	T2	T3	
Ácidos	Ácido acético	40.15 $\pm$ 0.8	15,8 $\pm$ 0.6	14.9 $\pm$ 0.23	Agrio, vinagre, astringente ^a
	Ácido butanoico	0.3 $\pm$ 0.04	0	0	Rancio ^a
	Ácido hexanoico	0	0	0	Rancio ^a
	Ácido isobutírico	4.5 $\pm$ 0.01	2.6 $\pm$ 0.4	1.8 $\pm$ 0.14	Rancio, queso ^a
	Ácido isovalérico	23.45 $\pm$ 0.6	13.1 $\pm$ 0.7	11.6 $\pm$ 0.31	Rancio ^a
	Ácido octanoico	0	0	0	Graso ^a

T1 (FN): Fermentación bajo condiciones artesanales en el municipio de Los Andes, Sotomayor; T2 (FN + CI): Fermentación bajo condiciones artesanales con cultivo iniciador en el municipio de Los Andes, Sotomayor; T3 (CI): Fermentación con cultivo iniciador bajo condiciones de laboratorio. Superíndices: Referencias sobre notas sabor/aroma: a: Utrilla et al., (2019); b: Moreira et al., (2017); c: Visintin et al., (2017); d: Rodriguez-Campos et al., (2012); e: Kadow et al., (2013).

9. Discusión

9.1 Selección de microorganismos con potencial fermentativo para el desarrollo del cultivo iniciador

En la industria del cacao hay muchos pasos involucrados para obtener productos de calidad, sin embargo, la fermentación es una etapa clave para desarrollar el sabor característico del chocolate en la cual intervienen una amplia diversidad de microorganismos. En consecuencia, el conocimiento de las especies microbianas que incrementan las características organolépticas del cacao es fundamental para el desarrollo de fermentaciones controladas, sobre todo en regiones en donde la calidad del producto es afectada por la aplicación de sistemas artesanales. En tal sentido, el aislamiento y selección de microorganismos con características metabólicas específicas son indispensables para el desarrollo de cultivos iniciadores.

9.1.1 Levaduras

Los criterios establecidos para la selección de LEV, asimilación de pectina como fuente de carbono y actividad de enzimas pectinolíticas, son fundamentales para mejorar la fermentación del cacao al facilitar una degradación más eficiente de la pulpa, inducir un aumento de la aireación en el sistema y acelerar el proceso de fermentación (Thompson et al., 2007). De igual forma, la actividad enzimática influye en la formación de compuestos volátiles (Castro-Alayo et al., 2019; Ouattara et al., 2020), muchos de los cuales son precursores de moléculas del sabor característico del cacao (Escobar et al., 2021).

La enzima PME cataliza la hidrólisis de los enlaces éster de metilo en el dominio homogalacturonano (HG) de la molécula de pectina, liberando los grupos carboxilo de las unidades poliméricas. Esta actividad es importante, ya que la liberación de dichos residuos permite la despolimerización del dominio HG por acción de otras enzimas como la PL (Salas-Tovar et al., 2017). Entre las LEV evaluadas en este estudio, se identificaron 20 aislados con una alta actividad enzimática de PME, aspecto que se plantea de alta relevancia, ya que en los estudios de Da-Silva et al., (2005) y Samagaci et al., (2015) no se reportó la presencia de alguna LEV con la capacidad de producir PME en fermentaciones de cacao. Por otro lado, Ouattara et al., (2008) si determinaron la actividad enzimática de PME, sin embargo, estos resultados solo se presentan como un carácter cualitativo para *Bacillus sp.*

Por otra parte, la enzima PL es de particular interés porque degrada directamente los polímeros de la molécula de pectina mediante un mecanismo de eliminación β que da como resultado la formación de oligogalacturónidos 4,5-insaturados; además, como se mencionó anteriormente tiene la capacidad de actuar de forma secuencial o simultánea con la enzima PME para la despolimerización del dominio HG (Yadav et al., 2009). Entre las LEV evaluadas en esta investigación, 14 aislados presentaron la mayor actividad enzimática de PL; estos resultados se presentan como un aporte importante, debido a que en los estudios de

Da-Silva et al., (2005) y Samagaci et al., (2015) sobre LEV aisladas de fermentaciones de cacao, no se detectó la producción de PL y la actividad pectinolítica únicamente se atribuyó para la enzima poligalacturonasa. Además, como en el caso de la enzima PME, la producción de la enzima PL generalmente se asocia con especies del género *Bacillus*, tal como lo informan Ouattara et al., (2011).

Cabe resaltar que el estudio de LEV con actividad enzimática de PME y PL, también es de interés en los procesos de fermentación de café. Por un lado, en el trabajo de Masoud & Jespersen, (2006) ninguna de las LEV presentó la capacidad de producir estas enzimas. Sin embargo, Haile & Kang, (2019) sí reportaron algunas LEV con una alta actividad enzimática de PME y PL alcanzadas las 48 h de fermentación. De tal manera, a pesar de las diferencias entre los procesos de fermentación, los resultados se relacionan con el reporte de aislados de LEV que cuentan con esta actividad enzimática.

9.1.2 Bacterias ácido lácticas

La presencia de un metabolismo heterofermentativo en las BAL se planteó como un criterio de selección, ya que las bacterias con esta propiedad utilizan la vía de las pentosas fosfato para la producción de sólo 1 molécula de ácido láctico, CO₂ y etanol a partir de 1 molécula de glucosa consumida (Papadimitriou et al., 2016). Mientras que las BAL homofermentativas emplean la vía de la glucólisis (Embden-Meyerhof) para la producción neta de 2 moléculas de ácido láctico por molécula de glucosa consumida (Wilhelm, 2014). Además, una vez identificadas las BAL heterofermentativas se seleccionó aquellas que presentaron la menor producción de ácido láctico, dado que una elevada concentración de dicho ácido disminuye significativamente la calidad de las semillas de cacao al conferir características sensoriales desagradables (Loureiro et al., 2017).

Entre las BAL evaluadas en esta investigación se identificaron 10 aislados con metabolismo heterofermentativo, lo cual se relaciona con los estudios realizados por Ouattara et al., (2014) y Lagunes-Gálvez et al., (2007), en donde todos los aislados que produjeron CO₂ se clasificaron como BAL heterofermentativas. En cuanto a la diferencia de producción de ácido láctico por parte de las BAL heterofermentativas, existe publicaciones que asocian dicha diferencia al tipo de metabolismo: facultativo o estricto. Para el primero, las BAL utilizan la glucosa y fructosa para una mayor producción neta de ácido láctico, a diferencia con la vía estricta que convierte parte de la fructosa en manitol u otros compuestos que disminuyen la producción de este ácido orgánico durante la fermentación (Ho et al., 2015; Illegghems et al., 2016).

9.1.3 Bacterias ácido acéticas

La acumulación de ácido láctico y ácido acético afectan de forma negativa la calidad del cacao fermentado (Camu et al., 2007), por lo cual una BAA con capacidad de oxidar estos compuestos es recomendable para incluirla en un cultivo iniciador. Bajo este criterio, se identificaron 10 aislados de BAA con la capacidad de oxidar acetato y lactato a una concentración del 3 %. Estos resultados sugieren la presencia de bacterias pertenecientes al género *Acetobacter*, las cuales presentan un metabolismo que permite la degradación de estos ácidos orgánicos en CO₂ y H₂O, principalmente por el ciclo del ácido tricarboxílico a través de la vía del piruvato (Gerard, 2015). Además, una concentración considerable de ácido láctico puede oxidarse en acetoina y una menor cantidad en ácido acético, siendo este último sobre oxidado por la misma ruta metabólica (Adler et al., 2014).

De acuerdo con la producción de ácido acético, no existió diferencias significativas entre los aislados mencionados (p-valor= 0.991). Estos resultados se asemejan a los reportados por Moens et al., (2014) en donde evaluaron cuatro especies del género *Acetobacter* en un medio que simuló la composición del mucílago de cacao, y describieron un comportamiento similar en cuanto a la producción de ácido acético para todos los aislados evaluados. Por otro lado, Soumahoro et al., (2020) mencionaron que aunque la producción de ácido acético fue similar entre las especies del género *Acetobacter*, se evidenció un comportamiento diferente en cuanto a su dinámica de producción. Aspecto que probablemente se relaciona con la capacidad de algunos aislados para direccionar el metabolismo de los sustratos disponibles hacia el aumento de su crecimiento, tal como se evidenció en esta investigación con respecto a las curvas de crecimiento evaluadas en el medio con mucílago de cacao.

9.2 Caracterización molecular de los microorganismos seleccionados para la formación del cultivo iniciador

Del total de LEV aisladas de los procesos de fermentación de cacao, el mayor número se identificó para los géneros *Candida* y *Saccharomyces*, por otra parte, el género *Pichia* estuvo representado con un menor número de aislados, resultados similares a los descritos por Romanens et al., (2019). *S. cerevisiae* presentó el mayor número de aislados, abundancia que probablemente se relaciona con su rápido crecimiento en un medio con pH ácido, capacidad metabólica para el consumo de diferentes azúcares y su actividad pectinolítica (Haile & Kang, 2019; Roini et al., 2019). (Figueroa-Hernández et al., 2019) en su revisión sobre la microbiota asociada a la fermentación de cacao en la última década, describieron que al igual que en esta investigación, *A. fabarum*, *A. tropicalis*, *L. brevis*, *L. plantarum*, *C. tropicalis*, *P. kudriavzevii* y *S. cerevisiae* están presentes en los procesos de fermentación bajo condiciones artesanales alrededor del mundo; no obstante, *A. okinawensis* y *C. glabrata* no se reportan en esta revisión. Por otro lado, en el estudio de Agyirifo et al., (2019) se reportó la presencia de *C. glabrata* en fermentaciones de cacao en

Ghana y el trabajo de H. G. Ouattara & Niamké, (2021) asocia la presencia de *A. okinawensis* en fermentaciones realizadas en Costa de Marfil.

9.2.1 Levaduras

La región ITS1-5.8s-ITS2 es un marcador molecular efectivo en la discriminación de aislados de LEV en comparación con otras regiones ribosomales, siendo bastante compatible con características bioquímicas y apropiado para la caracterización de especies (Porter & Brian-Golding, 2011; Schoch et al., 2012). Además, es utilizado con enfoques filogenéticos y métodos de RFLP para establecer las posibles relaciones entre unidades taxonómicas (Del-Prado et al., 2010; Kirchmayr & Flores, 2010). Con respecto al dominio D1/D2 ARNr (26S), generalmente es utilizado como un marcador molecular confirmatorio para la identificación de LEV, ya que contiene secuencias de bases altamente conservadas y suficientes variaciones de secuencia para la identificación entre especies (Mirhendi et al., 2005).

Con respecto a las relaciones establecidas por los análisis de distancias para las dos regiones mencionadas, el trabajo de Herrero (2005) explica que la cercanía entre los aislados de *S. cerevisiae* y *C. glabrata*, probablemente se asocia con la presencia de genes ortólogos que sugieren un origen evolutivo en común. De la misma manera, Butler et al., (2009) mencionan que *C. glabrata* exhibe una mayor relación filogenética dentro del género *Saccharomyces* que la separa del género *Candida*. Cabe resaltar que probablemente, dada la ausencia de una cantidad suficiente de secuencias y las bajas distancias genéticas entre los aislados en especial para la región D1/D2 ARNr 26S, en algunos casos se presentaron politomias a nivel intraespecífico, siendo fundamentales los análisis de RFLP para resolver estos casos (Hashim & Al-Shuhaib, 2019).

En este sentido, los resultados del análisis por RFLP para la región ITS1-5.8s-ITS2 se relacionan con las investigaciones de Fadda et al., (2013), Kirchmayr & Flores, (2010) y Samagaci et al., (2016), en donde describieron que las enzimas *HaeIII*, *HinfI* y *HhaI* permiten diferenciar de manera más precisa y rápida especies de LEV, algunas de estas pertenecientes a los géneros *Candida*, *Saccharomyces* y *Pichia*. Por su parte, Clavijo et al., (2011) y Dlačhy et al., (1999), mencionan que la enzima *HaeIII* permite establecer un patrón de RFLP similar entre los aislados de *S. cerevisiae*, lo cual se asemeja con los resultados de este estudio. De manera similar, en el trabajo realizado por Koffi et al., (2017), la enzima *HaeIII* permitió establecer un patrón de RFLP para diferenciar entre aislados de LEV asociadas a fermentaciones de cacao, incluyendo a *S. cerevisiae*, *P. kudriavzevii* y *C. tropicalis*. Por último, para el dominio D1/D2 ARNr (26S), los resultados se relacionan con los trabajos de Jang et al., (2009) y Mirhendi et al., (2005), ya que al implementar enzimas de restricción lograron diferenciar aislados de LEV de la misma especie, resaltando

específicamente a la enzima *HhaI* que generó patrones exclusivos para todas las especies y permitió resolver las relaciones intraespecíficas de los aislados que se encontraban en politomías para esta región.

9.2.2 Bacterias ácido lácticas

El análisis del gen 16S ARNr se ha utilizado ampliamente para identificar especies bacterianas, mediante estudios con enfoques filogenéticos y a través de métodos por RFLP (Chakravorty et al., 2007). En particular, la técnica de RFLP ha demostrado ser adecuada para discriminar especies estrechamente relacionadas y determinar el grado de variación a nivel intraespecífico (Moyer et al., 1996).

Con respecto al análisis de distancias para las BAL, los resultados se asemejan con las observaciones de Ramos et al., (2013) y Todorov & de Melo-Franco, (2010), indicando que los aislados de *L. plantarum* se mantienen separadas de *L. brevis* con base en el gen 16S ARNr. Además, Ehrmann & Vogel, (2005) describieron que la separación entre *L. plantarum* y *L. brevis* puede estar relacionada con las diferencias entre sus características metabólicas. Lo anterior se relaciona con el análisis por RFLP, siendo claves las enzimas *AluI* y *HaeIII* que permitieron diferenciar entre los aislados de *L. brevis* y *L. plantarum*, tal como lo describen Ouattara & Niamké, (2021) y Park et al., (2012). Además, los perfiles de RFLP de las enzimas *HinfI* y *TaqI* permitieron el correcto agrupamiento de los aislados *L. plantarum*, resultados que se corresponden con la investigación de Mancini et al., (2012).

9.2.3 Bacterias ácido acéticas

Con respecto al gen 16S ARNr de BAA, los análisis de distancias se encuentran relacionados con los trabajos de Pitiwittayakul et al., (2015) y Yamada (2016), en donde los árboles presentan una topología similar al separar con una mayor distancia el clado de *A. tropicalis* con respecto a la ubicación de los aislados de *A. okinawensis* y *A. fabarum* que estuvieron más cercanos. Sin embargo, es preciso mencionar que las inconsistencias entre las relaciones de los aislados de *A. okinawensis* y su raíz interna, probablemente se deben a las diferencias con respecto al origen de la secuencia de referencia y al grado de variabilidad genética dentro de la especie, caso similar al reportado por Ruiz et al., (2000). Sumado a esto, la presencia de una politomía en el clado de *A. tropicalis* hizo necesario el análisis por RFLP para resolver las relaciones entre los aislados.

Los resultados del análisis por RFLP se asemejan con los descritos por Jara et al., (2013), en donde el polimorfismo de los fragmentos producidos por la enzima *TaqI* permitió diferenciar adecuadamente entre especies del género *Acetobacter*. De la misma manera, Poblet et al., (2000) lograron discriminar entre géneros de BAA y entre aislados de las especies de *Acetobacter*, realizando la digestión con las

endonucleasas *TaqI*, *AluI* y *HaeIII*; de tal forma, se destacan las últimas dos enzimas que permitieron resolver la politomía entre los aislados de *A. tropicalis*.

9.3 Desarrollo del cultivo iniciador

Entre las LEV aisladas que tuvieron la mayor actividad enzimática de PME y PL, además del mayor crecimiento en un medio con pectina a 1%, *S. cerevisiae* y *P. kudriavzevii* fueron las que presentaron los resultados más altos. Lo cual se corresponde con el trabajo de Haile & Kang (2019), en donde describieron que estas especies tienen la capacidad de producir enzimas pectinolíticas (PME - PL) y se consideran como LEV potenciales para el desarrollo de cultivos iniciadores en fermentaciones de café. De igual forma, en fermentaciones de cacao la mayoría de los estudios resaltan la actividad pectinolítica de *S. cerevisiae* y *P. kudriavzevii* (Delgado-Ospina et al., 2020; Mendoza-Salazar et al., 2022; Ouattara et al., 2020; Romero-Cortes et al., 2018); sin embargo, dicha actividad generalmente es asociada a la enzima poligalacturonasa y, a diferencia con este trabajo, plantean improbable la presencia de enzimas pectinolíticas de tipo liasa y esterasa (Díaz-Muñoz & De Vuyst, 2021; Dzogbefia et al., 1999; Samagaci et al., 2014).

Cabe resaltar que *S. cerevisiae* ya ha sido implementada en cultivos iniciadores, debido a su capacidad de acelerar el consumo de carbohidratos, dando como resultado un incremento en las concentraciones de etanol. Además, puede influir positivamente en el perfil aromático de las semillas fermentadas y previene el crecimiento de microorganismos indeseables (Batista et al., 2016; Koné et al., 2016; Meersman et al., 2016; Ramos et al., 2014; Visintin et al., 2017). Por otro lado, *P. kudriavzevii* ha sido implementada para la formación de cultivos iniciadores por su potencial para la formación de compuestos volátiles específicos que mejoran la calidad del cacao (Castro-Alayo et al., 2019; Koné et al., 2016; Pereira. et al., 2017). Por lo tanto, los aislados *S. cerevisiae* L79 y *P. kudriavzevii* L51 fueron seleccionados para la conformación del cultivo iniciador, debido a que estas características metabólicas son fundamentales para mejorar la fermentación de cacao.

En cuanto a las BAL heterofermentativas, se seleccionó *L. brevis* debido a su baja producción de ácido láctico en comparación con *L. plantarum*. Estos resultados se asemejan a los reportados por Lefeber et al., (2011) y Viesser et al., (2020), quienes describieron una alta producción de ácido láctico por parte de *L. plantarum* en comparación con BAL heterofermentativas estrictas. De tal forma, *L. brevis* al ser caracterizada con un metabolismo heterofermentativo estricto (Filannino et al., 2014), carece de un mecanismo de represión de catabolitos de carbono que le permite utilizar diferentes azúcares simultáneamente; debido a esto, es posible la formación de otros subproductos como el etanol que disminuyen la producción neta de ácido láctico (Zhang & Vadlani, 2015).

Asimismo, la ausencia de una preferencia de sustratos por parte de *L. brevis*, probablemente se relaciona con la velocidad en la que se fermentan estos compuestos y por ende con su tasa de crecimiento (Wilhelm, 2014). Es así que en el trabajo de Kim et al., (2009), verificaron que el uso simultáneo de azúcares fermentables era una característica de la especie y no un rasgo a nivel de aislado, describiendo la misma capacidad catabólica y un crecimiento celular similar para tres aislados de *L. brevis*. Además, los estudios sobre la capacidad probiótica y antifúngica de *L. brevis* (Essia-Ngang et al., 2015; Fanche et al., 2020; Ramos et al., 2013), resaltan su importancia durante la fermentación de cacao; por lo cual, se seleccionó el aislado *L. brevis* BL06 para la conformación del cultivo iniciador.

Con respecto a la selección de BAA, entre los aislados con capacidad de oxidar acetato y lactato a 3 %, se identificaron *A. fabarum*, *A. tropicalis* y *A. okinawensis*, lo cual destaca la importancia del género *Acetobacter* por su capacidad de oxidar dichos compuestos a través del ciclo del ácido tricarbóxico (Mamlouk & Gullo, 2013). Esta propiedad es importante durante la fermentación de cacao, ya que el consumo de ácidos orgánicos permite establecer los rangos óptimos de pH para la actividad de enzimas pectinolíticas (Salas-Tovar et al., 2017; Yadav et al., 2009) y evita la presencia de notas sensoriales desagradables en las semillas fermentadas (Tuentner et al., 2020). Teniendo en cuenta que *A. okinawensis* presentó el mayor crecimiento con respecto a las otras BAA y ha sido estudiada por su tolerancia a elevados niveles de etanol y temperatura (Beheshti-Maal & Shafiee, 2019), se resalta la selección del aislado *A. okinawensis* BA10 para el desarrollo del cultivo iniciador.

Asimismo, su selección se considera importante, ya que *A. okinawensis* no ha sido implementada anteriormente en cultivos iniciadores para la fermentación de cacao, esto de acuerdo con la revisión de literatura realizada en este trabajo, en donde se utilizaron términos de búsqueda tales como: *Acetobacter okinawensis*, cultivo iniciador con *Acetobacter okinawensis*, cultivo iniciador para fermentaciones de cacao, tanto en el idioma español como en inglés; algunas de las bases de datos utilizadas fueron: *Science Direct*, *Dianlet*, *Springer Nature*, *Redalyc*, *Scielo*; también se incluyeron bases de datos sobre patentes como *Espacenet*, *Lens*, *Patentscope*, *OMPI* (organización mundial de la propiedad intelectual); y la revisión abarcó la información disponible hasta la fecha.

9.4 Determinación de la concentración de ácidos orgánicos no volátiles producidos en los diferentes tratamientos de fermentación mediante HPLC.

En los tres tratamientos, los niveles de ácido cítrico y oxálico disminuyeron de forma similar durante el proceso fermentativo, aspecto que indica que el cultivo iniciador presenta la capacidad para obtener concentraciones de ácidos orgánicos aproximadas a las obtenidas durante la fermentación realizada bajo condiciones artesanales (T1). Dicha reducción en la concentración indica que estas sustancias se utilizan

como fuente de carbono para el crecimiento microbiano o para la síntesis de otras sustancias. Existen suficientes evidencias que BAL heterofermentativas como *L. brevis* y algunas especies de LEV como *S. cerevisiae* y *P. kudriavzevii*, pueden consumir el ácido cítrico para la producción de diferentes compuestos, entre estos: ácido succínico, ácido acético, CO₂ y compuestos volátiles (Díaz-Muñoz & De Vuyst, 2021; Papadimitriou et al., 2016; Xi et al., 2021). Para el caso del ácido oxálico, su consumo puede estar relacionado con la actividad de LEV pectinolíticas que facilitan la liberación de oxalatos presentes en el mucílago de cacao (Nguyễn & Savage, 2013; Ouattara et al., 2020).

Por otra parte, en la fermentación artesanal más cultivo iniciador (T2), la producción de ácido succínico fue marcadamente superior durante las primeras 120 h de fermentación en comparación con los otros tratamientos, esta acumulación probablemente se atribuye al metabolismo de *S. cerevisiae* L79, *P. kudriavzevii* L51 y *L. brevis* BL06. Esto se debe a que BAL heterofermentativas producen éste ácido orgánico a partir del ácido cítrico y otras fuentes de carbono (Hugenholtz, 1993; Kaneuchi et al., 1988; Van Der Meulen et al., 2006); y las LEV generalmente lo producen a partir de azúcares y ácido acético que ingresan al ciclo del ácido tricarboxílico (De Vuyst & Leroy, 2020; Jayaram et al., 2013). Luego de las 120 horas de fermentación la concentración de ácido succínico disminuye progresivamente, aspecto que se atribuye a la incorporación de *A. okinawensis* BA10, ya que al pertenecer al género *Acetobacter* puede utilizar este ácido como fuente de energía en reemplazo de otras fuentes de carbono (Raspor & Goranovič, 2008).

Con respecto al ácido láctico, en los tres tratamientos hubo un incremento en la síntesis de este ácido al cabo de las 48 h de fermentación, no obstante, los tratamientos con cultivo iniciador registraron un valor inferior al obtenido para la fermentación realizada bajo condiciones artesanales. En este sentido, se destaca la presencia de las bacterias seleccionadas en el cultivo iniciador, debido a que *L. brevis* BL06 probablemente no contribuye con un aumento significativo en la producción de ácido láctico como consecuencia de su metabolismo heterofermentativo estricto (Gorbeña & Sáenz, 2017; Lefeber et al., 2010); y por su parte, *A. okinawensis* BA10 tiene la capacidad de oxidar el ácido láctico para la producción de ácido acético, siendo este último sobre oxidado que evita el aumento de acidez en las semillas de cacao (Moens et al., 2014).

Con base en lo anterior, al cabo de los 8 días de la fermentación los tratamientos con cultivo iniciador presentaron las menores concentraciones para el ácido láctico y succínico; y se destaca el T2 el cual registro las menores concentraciones para todos los ácidos evaluados. De tal manera, los resultados están de acuerdo con las investigaciones de Craface et al., (2013, 2014), Igor et al., (2017) y Sandhya et al., (2016), en donde

se reportó que las concentraciones de ácidos orgánicos en presencia de un cultivo iniciador fueron menores a las cantidades cuantificadas en fermentaciones bajo condiciones artesanales.

9.5 Cuantificación de compuestos volátiles formados en los diferentes tratamientos de fermentación mediante SPME-HS y GC-MS.

En relación a la producción de alcoholes, al final de los procesos de fermentación se observó que las semillas del T2 y T3 se caracterizaron por presentar las mayores concentraciones de 3-metil-1-butanol, 2-nonanol, 2-feniletanol y 2-butanol, confiriéndoles notas de malta, chocolate, mantequilla, florales y vino; mientras que el T1 registró una mayor concentración de 2-pentanol que atribuye notas herbales y pastosas (Tabla 15). En este sentido, es evidente la importancia de *P. kudriavzevii* y *S. cerevisiae* como parte del cultivo iniciador, ya que la formación de estos compuestos está relacionada con su metabolismo de aminoácidos (Chagas-Junior et al., 2021; Moreira et al., 2021; Ouattara et al., 2020), siendo un aspecto fundamental para obtener semillas que cuenten con un perfil aromático de buena calidad (Pires et al., 2014; Rodriguez-Campos et al., 2012).

Con respecto a los ésteres, el T2 presentó una mayor cantidad de ésteres de acetato y el T3 una mayor cantidad de ésteres de etilo. Esto se relaciona con el tipo de alcoholes registrados en dichos tratamientos a lo largo de la fermentación, ya que los ésteres de acetato son sintetizados a partir de alcoholes superiores más acetil-CoA y los ésteres etílicos se sintetizan de etanol más acil-CoA (Procopio et al., 2011). Además, uno de los factores determinantes para la síntesis de ésteres son las especies de LEV presentes durante la fermentación, y por tanto las variaciones en aroma y sabor se encuentran relacionadas con las diferencias interespecíficas asociadas con los mecanismos que regulan la expresión de genes responsables de la síntesis de estos compuestos (Loviso & Libkind, 2018). Al respecto, se describió que *S. cerevisiae* y *P. kudriavzevii* presentan enzimas claves para la producción de ambos tipos de ésteres (Chagas-Junior et al., 2021; Dzialo et al., 2017). Es de señalar que los ésteres se consideran como marcadores de calidad sensorial de las semillas de cacao, puesto que aparte de contribuir con notas dulces y florales, la mayoría de estos compuestos permanecen después de los procesos de secado y tostado (Meersman et al., 2013; Mota-Gutierrez et al., 2019).

De acuerdo con los compuestos de tipo aldehído, solo los tratamientos con presencia del cultivo iniciador presentaron la formación de 2-metilbutanal y 3-metilbutanal al final de la fermentación, y específicamente el T2 presentó la mayor concentración de fenilacetaldehído. De tal forma, se resalta el papel de LEV y BAL heterofermentativas al permitir la formación de estos compuestos como resultado del metabolismo de aminoácidos (De Vuyst & Leroy, 2020). En este sentido, los trabajos de Moreira et al., (2021), Mota-Gutierrez et al., (2019) y Ouattara et al., (2020) asociaron a *S. cerevisiae* y *P. kudriavzevii* con la producción

de estos compuestos. Asimismo, Luc De Vuyst & Leroy, (2020) describieron que las BAL heterofermentativas inducen la formación de 2-metilbutanal y 3-metilbutanal; y en concreto, para *L. brevis* algunas secuencias genómicas codifican reacciones enzimáticas para la biosíntesis de fenilacetaldehído (Agyirifo et al., 2019). Es de señalar que los aldehídos, además de ser cruciales para el desarrollo del buen sabor y aroma de las semillas de cacao por contribuir notas dulces, malta y chocolate (Rodríguez-Campos et al., 2012), juegan un papel importante como precursores para la formación de pirazinas durante los procesos de secado y tostado (Ziegleder, 2009).

Por otra parte, la mayoría de las cetonas se forman por la degradación de aminoácidos durante el proceso de tostado, sin embargo, también se pueden presentar en bajas cantidades durante la fermentación (Andrade et al., 2021); tal como pasó en esta investigación y en lo descrito por Dulce et al., (2021). Entre los tratamientos evaluados al final de la fermentación, el T2 presentó la mayor concentración de 2-heptanona, 2-nonanona y acetoína, donde esta última ha sido reportada como un precursor de la tetrametilpirazina, un importante componente activo del aroma y sabor de las semillas de cacao (Owusu, 2010; Owusu et al., 2012). Es de señalar que la síntesis de acetoína y otros compuestos cetónicos se atribuye a BAL heterofermentativas y BAA del género *Acetobacter* (Agyirifo et al., 2019). Por lo cual, la presencia de estos compuestos en el T2 se relaciona con las bacterias *L. brevis* BL06 y *A. okinawensis* BA10, que hacen parte del cultivo iniciador desarrollado en esta investigación.

Durante la fermentación de cacao, la concentración de ácidos volátiles aumenta como resultado del metabolismo de los diferentes grupos microbianos (Papalexandratou et al., 2011). Generalmente, el ácido acético es el compuesto con mayor concentración durante los procesos de fermentación bajo condiciones artesanales, proporcionando notas agrias y avinagradas en las semillas (Ho et al., 2018). Es de señalar que en el T1 se registró la mayor concentración de este compuesto en comparación con los otros tratamientos, además, en el T1 se identificó los niveles más altos de otros ácidos carboxílicos como el isobutírico, isovalérico, butanoico y octanoico, caracterizados por producir características sensoriales indeseables con notas de queso, rancias y amargas (Utrilla et al., 2019). De tal forma, la adición del cultivo iniciador fue fundamental para controlar y reducir la producción de estos ácidos, y específicamente del ácido acético por acción del aislado *A. okinawensis* BA10, que tiene la capacidad de sobre oxidar dicho ácido evitando el aumento de acidez en las semillas al final de la fermentación.

Por último, se ha informado que los hidrocarburos y terpenos son uno de los principales contribuyentes para la diferenciación de aromas del cacao fermentado de sabores finos (Cevallos-Cevallos et al., 2018). Los resultados obtenidos muestran que el T2 posee la mayor cantidad de estos compuestos, resaltando la identificación de trans- β -ocimeno al final de la fermentación, que le confiere al cacao notas dulces, florales

y herbales (Kadow et al., 2013). Es de importancia la cantidad de hidrocarburos presentes en las semillas, debido a que su presencia categoriza al cacao de tipo especial y fino, mientras que las semillas con ausencia de estos compuestos son categorizadas con baja calidad (Utrilla et al., 2019). Otro compuesto identificado en el T2 fue el linalol, es de importancia debido a que confiere un aroma floral, frondoso y similar al té (Rodriguez-Campos et al., 2012). El linalol se utiliza como índice de sabor, en donde la proporción de linalol/benzaldehído indica semillas con calidad fina, al presentar valores mayores a 0.3 (Aprotosoie et al., 2016), en este sentido, el cacao fermentado de los tratamientos con cultivo iniciador se considera de alta calidad.

10. Conclusiones

Sobre la selección de microorganismos para el desarrollo del cultivo iniciador, se determinó que los aislados de *S. cerevisiae*, *P. kudriavzevii*, *C. glabrata* y *C. tropicalis* presentan la mayor actividad enzimática de PME del total de LEV aisladas de los procesos de fermentación de cacao. De igual forma, se registró que estos aislados cuentan con la capacidad para producir PL y se resaltan *S. cerevisiae* y *P. kudriavzevii* por presentar los niveles más elevados de actividad enzimática. Es preciso mencionar que este es uno de los primeros reportes sobre la producción de estas enzimas por parte de LEV aisladas de fermentaciones de cacao. Por otro lado, dentro del grupo de BAL heterofermentativas, los aislados de *L. brevis* presentaron una menor producción de ácido láctico en comparación con *L. plantarum*; y a nivel intraespecífico, los aislados de *L. brevis* no se diferencian significativamente con respecto al crecimiento celular en el medio con mucílago de cacao. A su vez, dentro del grupo de BAA que oxidaron acetato y lactato a 3%, no se encontraron diferencias significativas en cuanto a la producción de ácido acético, no obstante, los aislados de *A. okinawensis* tuvieron el mayor crecimiento en el medio con mucílago de cacao en comparación con *A. tropicalis* y *A. fabarum*.

De acuerdo con la caracterización molecular, la identificación de los aislados estuvo respaldada por una elevada coincidencia nucleotídica de las secuencias obtenidas con respecto a las disponibles en la base de datos del *GenBank* en el análisis por BLAST. Asimismo, en la mayoría de los casos, los análisis de distancias por *Neighbor-joining* relacionaron correctamente los aislados pertenecientes a la misma especie, con excepción de algunas politomías en el clado de *S. cerevisiae* y *P. kudriavzevii* para la región D1/D2 ARNr (26S) y en el clado de *A. tropicalis* para la región 16S ARNr. Además, fue evidente la dificultad para establecer los clados de *A. fabarum* y *A. okinawensis*, en donde las raíces internas se agruparon entre sí.

A través de los análisis por RFLP se confirmaron las diferencias moleculares entre las especies identificadas y se resolvieron las relaciones intraespecíficas de los aislados. Para la región ITS1-5.8s-ITS2 ARNr, las enzimas *MseI*, *HinfI* y *HaeIII* lograron agrupar correctamente los aislados de LEV para una misma especie. De la misma manera, estas dos últimas enzimas generaron fragmentos de RFLP exclusivos que permitieron diferenciar entre los aislados de LEV para la región D1/D2 (26S). Cabe resaltar que las enzimas *HhaI* y *HaeIII* permitieron resolver las politomías evidenciadas en los clados de *S. cerevisiae* y *P. kudriavzevii*. Por otro lado, para la región 16S ARNr de las BAL, las enzimas *AluI* y *HaeIII* permitieron la correcta agrupación de los aislados de *L. brevis* y *L. plantarum* en clusters diferentes; y por último, los patrones de RFLP generados con la enzima *TaqI* permitieron la correcta clasificación de los aislados de BAA en 3 cluster bien definidos, correspondientes a las 3 especies registradas. Adicionalmente, las enzimas *HaeIII* y

AluI permitieron resolver las relaciones internas entre los aislados de *A. tropicalis* que anteriormente exhibieron una politomía.

En cuanto a la concentración de ácidos orgánicos no volátiles, los análisis realizados por HPLC indicaron diferencias significativas entre los tratamientos que contenían el cultivo iniciador y los que no. Siendo el caso del ácido láctico que estuvo en mayor cantidad en el T1, en contraste con el T2 y T3 que registraron las menores concentraciones a lo largo de la fermentación. En lo que refiere al ácido succínico, los mayores picos de producción y el consumo total del mismo al final de la fermentación se asociaron para el T2. Por otro lado, a pesar de la ausencia de diferencias estadísticamente significativas entre las cantidades de ácido cítrico y oxálico, se resalta la influencia del cultivo iniciador en el T2 y T3, los cuales registraron las menores concentraciones durante el transcurso de la fermentación.

Por último, con respecto al perfil cualitativo y cuantitativo de los compuestos volátiles determinado para cada tratamiento, es evidente que el inóculo de *S. cerevisiae* L79, *P. kudriavzevii* L51, *L. brevis* B06 y *A. okinawensis* B10, resulta importante para controlar el proceso de fermentación de cacao hacia la obtención de semillas con características sensoriales en las que dominen notas frutales, florales, dulces, malta y chocolate. Lo cual se encuentra estrechamente relacionado con las concentraciones registradas al final de la fermentación para los T2 y T3, destacando la formación de: alcoholes (2-nonanol, 3-metil-1-butanol, 2-feniletanol), ésteres (acetato de 2-feniletilo, acetato de 2-pentilo, acetato de 2-heptilo, acetato de isoamilo, etil hexanoato, etil fenil acetato, etil octanoato), aldehídos (2-metilbutanal, 3-metilbutanal), cetonas (acetoína, 2-heptanona, 2-nonanona) y otros compuestos (linalol, trans- β -ocimeno). Por lo tanto, la implementación del cultivo iniciador se plantea como una metodología prometedora para mejorar las características sensoriales y establecer un perfil de compuestos volátiles específico en las semillas de cacao fermentadas.

11. Recomendaciones

Aparte del estudio se observó una actividad antifúngica del cultivo iniciador en las semillas de cacao, por lo cual, se requieren estudios posteriores para evaluar cómo los microorganismos implementados contrarrestan el crecimiento de moho al final del proceso de fermentación. También se considera pertinente la implementación de técnicas moleculares como: metagenómica y electroforesis en gel con gradiente de desnaturalización (DGGE) acompañada con procesos de secuenciación que permitan confirmar la presencia del cultivo iniciador a lo largo de la fermentación de cacao. Por último, se recomienda evaluar el perfil de compuestos volátiles y no volátiles de las semillas fermentadas con cultivo iniciador, después de los procesos de secado y tostado.

12. Referencias

- Adler, P., Frey, L. J., Berger, A., Bolten, C. J., Hansen, C. E., & Wittmann, C. (2014). The key to acetate: Metabolic fluxes of acetic acid bacteria under cocoa pulp fermentation-simulating conditions. *Applied and Environmental Microbiology*, 80(15), 4702–4716. <https://doi.org/10.1128/AEM.01048-14>
- Afoakwa, E. O. (2014). Cocoa Production and Processing Technology. In *Cocoa Production and Processing Technology*. <https://doi.org/10.1201/b16546>
- Afoakwa, E. O. (2016). *Chocolate Science and Technology* (L. John Wiley & Sons (ed.); second edi). <https://doi.org/10.1002/9781118913758>
- Afoakwa, E. O., Paterson, A., Fowler, M., & Ryan, A. (2008). Flavor formation and character in cocoa and chocolate: A critical review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 48(9), 840–857. <https://doi.org/10.1080/10408390701719272>
- Afoakwa, E. O., Quao, J., Budu, A. S., Takrama, J., & Saalia, F. K. (2011). Effect of pulp preconditioning on acidification, proteolysis, sugars and free fatty acids concentration during fermentation of cocoa (*Theobroma cacao*) beans. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 62(7), 755–764. <https://doi.org/10.3109/09637486.2011.581224>
- Afoakwa, E. O., Quao, J., Takrama, F. S., Budu, A. S., & Saalia, F. K. (2012). Changes in the Polyphenol in Fermented Beans. *International Food Research Journal*, 19(3), 1071–1077.
- Afoakwa, E. O., Quao, J., Takrama, J., Budu, A. S., & Saalia, F. K. (2013). Chemical composition and physical quality characteristics of Ghanaian cocoa beans as affected by pulp pre-conditioning and fermentation. *Journal of Food Science and Technology*, 50(6), 1097–1105. <https://doi.org/10.1007/s13197-011-0446-5>
- Agyirifo, D. S., Wamalwa, M., Otwe, E. P., Galyuon, I., Runo, S., Takrama, J., & Ngeranwa, J. (2019). Metagenomics analysis of cocoa bean fermentation microbiome identifying species diversity and putative functional capabilities. *Heliyon*, 5(7), e02170. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2019.e02170>
- Andrade, A., Lins da Cruz, M., Antonia de Souza Oliveira, F., Soares, S. E., Druzian, J. I., Radomille de Santana, L. R., Oliveira de Souza, C., & da Silva Bispo, E. (2021). Influence of under-fermented cocoa mass in chocolate production: Sensory acceptance and volatile profile characterization during the processing. *Lwt*, 149(June), 112048. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2021.112048>
- Aprotosoaie, A. C., Luca, S. V., & Miron, A. (2016). Flavor Chemistry of Cocoa and Cocoa Products-An Overview. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 15(1), 73–91. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12180>

- Ardhana, M. M. (1990). *Microbial Ecology and Biochemistry Of Cocoa Bean Fermentation*. August, 294.
- Ardhana, M. M., & Fleet, G. H. (2003). The microbial ecology of cocoa bean fermentations in Indonesia. *International Journal of Food Microbiology*, 86(1–2), 87–99. [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(03\)00081-3](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(03)00081-3)
- Badrie, N., Bekele, F., Sikora, E., & Sikora, M. (2015). Cocoa Agronomy, Quality, Nutritional, and Health Aspects. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 55(5), 620–659. <https://doi.org/10.1080/10408398.2012.669428>
- Batista, N. N., Ramos, C. L., Dias, D. R., Pinheiro, A. C. M., & Schwan, R. F. (2016). The impact of yeast starter cultures on the microbial communities and volatile compounds in cocoa fermentation and the resulting sensory attributes of chocolate. *Journal of Food Science and Technology*, 53(2), 1101–1110. <https://doi.org/10.1007/s13197-015-2132-5>
- Beckett, S. T. (2008). The science of chocolate. In *RSC publishing* (2nd Editio, Vol. 38, Issue 06). The Royal Society of Chemistry. <https://doi.org/10.5860/choice.38-3330>
- Beheshti-Maal, K., & Shafiee, N. (2019). *A novel thermo- ethanol tolerant Acetobacter okinawensis KBMNS-IAUF-1 isolated from Iranian nectarine as a potential for nectarine vinegar production in food biotechnology*. 1–14. <https://doi.org/10.21203/rs.2.11979/v1>
- Bhinder, S., Singh, B., Kaur, A., Singh, N., Kaur, M., Kumari, S., & Yadav, M. P. (2019). Effect of infrared roasting on antioxidant activity, phenolic composition and Maillard reaction products of Tartary buckwheat varieties. *Food Chemistry*, 285(October 2018), 240–251. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.01.141>
- Biehl, B., & Ziegleder, G. (2003). Cocoa. *Chemistry of Processing*, 739–766. <https://doi.org/10.1016/B0-12-227055-X/00261-3>
- Biodiversity International. (2021). *2021 Award Winners — Cocoa Of Excellence*. <http://www.cocoaofexcellence.org/2021-award-winners>
- Blanco, P., Sieiro, C., & Villa, T. G. (1999). Production of pectic enzymes in yeasts. *FEMS Microbiology Letters*, 175(1), 1–9. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1999.tb13595.x>
- Bordiga, M., Locatelli, M., Travaglia, F., Coisson, J. D., Mazza, G., & Arlorio, M. (2015). Evaluation of the effect of processing on cocoa polyphenols: Antiradical activity, anthocyanins and procyanidins profiling from raw beans to chocolate. *International Journal of Food Science and Technology*, 50(3), 840–848. <https://doi.org/10.1111/ijfs.12760>
- Butler, G., Rasmussen, M. D., Lin, M. F., Santos, M. A. S., Sakthikumar, S., Munro, C. A., Rheinbay, E., Grabherr, M., Forche, A., Reedy, J. L., Agrafioti, I., Arnaud, M. B., Bates, S., Brown, A. J. P., Brunke, S., Costanzo, M. C., Fitzpatrick, D. A., De Groot, P. W. J., Harris, D., ... Cuomo, C. A. (2009). Evolution of pathogenicity and sexual reproduction in eight *Candida* genomes. *Nature*,

- 459(7247), 657–662. <https://doi.org/10.1038/nature08064>
- Calvo, A. M., Botina, B. L., García, M. C., Cardona, W. A., Montenegro, A. C., & Criollo, J. (2021). Dynamics of cocoa fermentation and its effect on quality. *Scientific Reports*, 11(1), 1–15. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-95703-2>
- Camu, N., De Winter, T., Verbrugghe, K., Cleenwerck, I., Vandamme, P., Takrama, J. S., Vancanneyt, M., & De Vuyst, L. (2007). Dynamics and biodiversity of populations of lactic acid bacteria and acetic acid bacteria involved in spontaneous heap fermentation of cocoa beans in Ghana. *Applied and Environmental Microbiology*, 73(6), 1809–1824. <https://doi.org/10.1128/AEM.02189-06>
- Casal, M., Paiva, S., Queirós, O., & Soares-Silva, I. (2008). Transport of carboxylic acids in yeasts. *FEMS Microbiology Reviews*, 32(6), 974–994. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2008.00128.x>
- Castro-Alayo, E. M., Idrogo-Vásquez, G., Siche, R., & Cardenas-Toro, F. P. (2019). Formation of aromatic compounds precursors during fermentation of Criollo and Forastero cocoa. *Heliyon*, 5(1). <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2019.e01157>
- Cevallos-Cevallos, J. M., Gysel, L., Maridueña-Zavala, M. G., & Molina-Miranda, M. J. (2018). Time-Related Changes in Volatile Compounds during Fermentation of Bulk and Fine-Flavor Cocoa (Theobroma cacao) Beans. *Journal of Food Quality*, 2018. <https://doi.org/10.1155/2018/1758381>
- Chagas-Junior, G., Ferreira, N. R., & Lopes, A. S. (2021). The microbiota diversity identified during the cocoa fermentation and the benefits of the starter cultures use: an overview. *International Journal of Food Science and Technology*, 56(2), 544–552. <https://doi.org/10.1111/ijfs.14740>
- Chakravorty, S., Helb, D., Burday, M., Connell, N., & Alland, D. (2007). A detailed analysis of 16S ribosomal RNA gene segments for the diagnosis of pathogenic bacteria. *Journal of Microbiological Methods*, 69(2), 330–339. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2007.02.005>
- Clavijo, A., Calderón, I. L., & Paneque, P. (2011). Yeast assessment during alcoholic fermentation inoculated with a natural “pied de cuve” or a commercial yeast strain. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 27(7), 1569–1577. <https://doi.org/10.1007/s11274-010-0609-y>
- Colonges, K., Jimenez, J. C., Saltos, A., Seguíne, E., Lóor Solorzano, R. G., Fouet, O., Argout, X., Assemat, S., Davrieux, F., Cros, E., Lanaud, C., & Boulanger, R. (2022). Integration of GWAS, metabolomics, and sensorial analyses to reveal novel metabolic pathways involved in cocoa fruity aroma GWAS of fruity aroma in Theobroma cacao. *Plant Physiology and Biochemistry*, 171, 213–225. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2021.11.006>
- Copetti, M. V., Iamanaka, B. T., Mororó, R. C., Pereira, J. L., Frisvad, J. C., & Taniwaki, M. H. (2012). The effect of cocoa fermentation and weak organic acids on growth and ochratoxin A production by *Aspergillus* species. *International Journal of Food Microbiology*, 155(3), 158–164. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2012.01.026>

- Cornejo, O. E., Yee, M. C., Dominguez, V., Andrews, M., Sockell, A., Strandberg, E., Livingstone, D., Stack, C., Romero, A., Umaharan, P., Royaert, S., Tawari, N. R., Ng, P., Gutierrez, O., Phillips, W., Mockaitis, K., Bustamante, C. D., & Motamayor, J. C. (2018). Population genomic analyses of the chocolate tree, *Theobroma cacao* L., provide insights into its domestication process. *Communications Biology*, 1(1), 1–12. <https://doi.org/10.1038/s42003-018-0168-6>
- Counet, C., Callemien, D., Ouwerx, C., & Collin, S. (2002). Use of gas chromatography-olfactometry to identify key odorant compounds in dark chocolate. Comparison of samples before and after conching. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(8), 2385–2391. <https://doi.org/10.1021/jf0114177>
- Crafack, M., Keul, H., Eskildsen, C. E., Petersen, M. A., Saerens, S., Blennow, A., Skovmand-Larsen, M., Swiegers, J. H., Petersen, G. B., Heimdal, H., & Nielsen, D. S. (2014). Impact of starter cultures and fermentation techniques on the volatile aroma and sensory profile of chocolate. *Food Research International*, 63, 306–316. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2014.04.032>
- Crafack, M., Saerens, S., Knudsen, M., Swiegers, J. H., Heimdal, H., Takrama, J., Nielsen, D. S., Mikkelsen, M. B., Blennow, A., Lowor, S., & Petersen, G. B. (2013). Influencing cocoa flavour using *Pichia kluyveri* and *Kluyveromyces marxianus* in a defined mixed starter culture for cocoa fermentation. *International Journal of Food Microbiology*, 167(1), 103–116. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2013.06.024>
- Cruxen, C. E. dos S., Funck, G. D., Haubert, L., Dannenberg, G. da S., Marques, J. de L., Chaves, F. C., da Silva, W. P., & Fiorentini, Â. M. (2019). Selection of native bacterial starter culture in the production of fermented meat sausages: Application potential, safety aspects, and emerging technologies. *Food Research International*, 122, 371–382. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2019.04.018>
- Da-Silva, G., Borges, M. D. F., Medina, C., Piccoli, R. H., & Schwan, R. F. (2005). Pectinolytic enzymes secreted by yeasts from tropical fruits. *FEMS Yeast Research*, 5(9), 859–865. <https://doi.org/10.1016/j.femsyr.2005.02.006>
- Daniel, H. M., Vrancken, G., Takrama, J. F., Camu, N., De Vos, P., & De Vuyst, L. (2009). Yeast diversity of Ghanaian cocoa bean heap fermentations. *FEMS Yeast Research*, 9(5), 774–783. <https://doi.org/10.1111/j.1567-1364.2009.00520.x>
- de Araújo, J. A., Ferreira, N. R., da Silva, S. H. M., Oliveira, G., Monteiro, R. C., Alves, Y. F. M., & Lopes, A. S. (2019). Filamentous fungi diversity in the natural fermentation of Amazonian cocoa beans and the microbial enzyme activities. *Annals of Microbiology*, 69(9), 975–987. <https://doi.org/10.1007/s13213-019-01488-1>
- De Brito, E. S., García, N. H. P., Gallão, M. I., Cortelazzo, A. L., Fevereiro, P. S., & Braga, M. R. (2001).

- Structural and chemical changes in cocoa (*Theobroma cacao* L) during fermentation, drying and roasting. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 81(2), 281–288.
[https://doi.org/10.1002/1097-0010\(20010115\)81:2<281::AID-JSFA808>3.0.CO;2-B](https://doi.org/10.1002/1097-0010(20010115)81:2<281::AID-JSFA808>3.0.CO;2-B)
- De Bruyne, K., Camu, N., De Vuyst, L., & Vandamme, P. (2010). *Weissella fabaria* sp. nov., from a Ghanaian cocoa fermentation. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 60(9), 1999–2005. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.019323-0>
- De Vuyst, L., & Leroy, F. (2020). Functional role of yeasts, lactic acid bacteria and acetic acid bacteria in cocoa fermentation processes. *FEMS Microbiology Reviews*, 44(4), 432–453.
<https://doi.org/10.1093/femsre/fuaa014>
- De Vuyst, L., & Weckx, S. (2016). The cocoa bean fermentation process: from ecosystem analysis to starter culture development. *Journal of Applied Microbiology*, 121(1), 5–17.
<https://doi.org/10.1111/jam.13045>
- Del-Prado, R., Cubas, P., Lumbsch, H. T., Divakar, P. K., Blanco, O., de Paz, G. A., Molina, M. C., & Crespo, A. (2010). Genetic distances within and among species in monophyletic lineages of Parmeliaceae (Ascomycota) as a tool for taxon delimitation. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 56(1), 125–133. <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2010.04.014>
- Delgado-Ospina, J., Triboletti, S., Alessandria, V., Serio, A., Sergi, M., Paparella, A., Rantsiou, K., & Chaves-López, C. (2020). Functional biodiversity of yeasts isolated from Colombian fermented and dry Cocoa beans. *Microorganisms*, 8(7), 1–17. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8071086>
- Delgado, Y. (2020). " Los Andes Vive El Cambio ". In *plan de desarrollo municipal 2020-2023*.
- Díaz-Muñoz, C., & De Vuyst, L. (2021). Functional yeast starter cultures for cocoa fermentation. *Journal of Applied Microbiology*, September, 1–28. <https://doi.org/10.1111/jam.15312>
- Dlauchy, D., Tornai-Lehocski, J., & Péter, G. (1999). Restriction enzyme analysis of PCR amplified rDNA as a taxonomic tool in yeast identification. *Systematic and Applied Microbiology*, 22(3), 445–453. [https://doi.org/10.1016/S0723-2020\(99\)80054-X](https://doi.org/10.1016/S0723-2020(99)80054-X)
- Dulce, V. R., Anne, G., Manuel, K., Carlos, A. A., Jacobo, R. C., Sergio de Jesús, C. E., & Eugenia, L. C. (2021). Cocoa bean turning as a method for redirecting the aroma compound profile in artisanal cocoa fermentation. *Heliyon*, 7(8). <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2021.e07694>
- Dzelagha, B. F., Ngwa, N. M., & Bup, D. N. (2020). A review of cocoa drying technologies and the effect on bean quality parameters. *International Journal of Food Science*, 2020.
<https://doi.org/10.1155/2020/8830127>
- Dzialo, M. C., Park, R., Steensels, J., Lievens, B., & Verstrepen, K. J. (2017). Physiology, ecology and industrial applications of aroma formation in yeast. *FEMS Microbiology Reviews*, 41(June), S95–S128. <https://doi.org/10.1093/femsre/fux031>

- Dzogbefia, V. P., Buamah, R., & Oldham, J. H. (1999). The controlled fermentation of cocoa (*Theobroma cacao* L) using yeasts: Enzymatic process and associated physico-chemical changes in cocoa sweatings. *Food Biotechnology*, 13(1), 1–12. <https://doi.org/10.1080/08905439609549958>
- Ehrmann, M. A., & Vogel, R. F. (2005). Molecular taxonomy and genetics of sourdough lactic acid bacteria. *Trends in Food Science and Technology*, 16(1–3), 31–42. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2004.06.004>
- Escobar, S., Santander, M., Useche, P., Contreras, C., & Rodríguez, J. (2020). Aligning strategic objectives with research and development activities in a soft commodity sector: A technological plan for colombian cocoa producers. *Agriculture (Switzerland)*, 10(5). <https://doi.org/10.3390/agriculture10050141>
- Escobar, S., Santander, M., Zuluaga, M., Chacón, I., Rodríguez, J., & Vaillant, F. (2021). Fine cocoa beans production: Tracking aroma precursors through a comprehensive analysis of flavor attributes formation. *Food Chemistry*, 365(July). <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.130627>
- Essia-Ngang, J. J., Yadang, G., Sado Kamdem, S. L., Kouebou, C. P., Youte Fanche, S. A., Tsochi Kougan, D. L., Tsoungui, A., & Etoa, F. X. (2015). Antifungal properties of selected lactic acid bacteria and application in the biological control of ochratoxin A producing fungi during cocoa fermentation. *Biocontrol Science and Technology*, 25(3), 245–259. <https://doi.org/10.1080/09583157.2014.969195>
- Facundo, X., Apodaca, M., & Crisci, J. (2020). *ANÁLISIS MULTIVARIADO PARA DATOS BIOLÓGICOS Teoría y su aplicación utilizando el lenguaje R* (V. M. EDITORES (ed.); 1era Edici). Fundación de Historia Natural Félix de Azara.
- Fadda, M. E., Pisano, M. B., Scaccabarozzi, L., Mossa, V., Deplano, M., Moroni, P., Liciardi, M., & Cosentino, S. (2013). Use of PCR-restriction fragment length polymorphism analysis for identification of yeast species isolated from bovine intramammary infection. *Journal of Dairy Science*, 96(12), 7692–7697. <https://doi.org/10.3168/jds.2013-6996>
- Fanche, S., Tchokonthe, A., Diguță, C., Kamdem, S., & Israel, R. (2020). Antifungal properties of lactic acid bacteria isolated from cocoa beans fermentation in the centre region of Cameroon. *Romanian Biotechnological Letters*, 25(2), 1407–1417. <https://doi.org/10.25083/rbl/25.2/1407.1417>
- Fedecacao. (2020). *Economía Internacional | Sitefedecacao*. <https://www.fedecacao.com.co/economiainternacional>
- Fedecacao. (2022). *La producción cacaotera nacional sigue creciendo: en 2021 logra un nuevo récord histórico*. 2022. <https://www.fedecacao.com.co/post/la-producción-cacaotera-nacional-sigue-creciendo-en-2021-logra-un-nuevo-récord-histórico>
- Fernández-Maura, Y., Balzarini, T., Clapé Borges, P., Evrard, P., De Vuyst, L., & Daniel, H. M. (2016).

- The environmental and intrinsic yeast diversity of Cuban cocoa bean heap fermentations. *International Journal of Food Microbiology*, 233, 34–43.
<https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2016.06.012>
- Figueroa-Hernández, C., Mota-Gutierrez, J., Ferrocino, I., Hernández-Estrada, Z. J., González-Ríos, O., Cocolin, L., & Suárez-Quiroz, M. L. (2019). The challenges and perspectives of the selection of starter cultures for fermented cocoa beans. *International Journal of Food Microbiology*, 301(April), 41–50. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2019.05.002>
- Filannino, P., Gobbetti, M., De Angelis, M., & Di Cagno, R. (2014). Hydroxycinnamic acids used as external acceptors of electrons: An energetic advantage for strictly heterofermentative lactic acid bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 80(24), 7574–7582.
<https://doi.org/10.1128/AEM.02413-14>
- Fowler, M. (2009). COCOA BEANS: FROM TREE TO FACTORY. In S. T. Beckett (Ed.), *Industrial Chocolate Manufacture and Use* (4th ed). Steve Beckett.
- Frauendorfer, F., & Schieberle, P. (2008). Changes in key aroma compounds of Criollo cocoa beans during roasting. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(21), 10244–10251.
<https://doi.org/10.1021/jf802098f>
- Ganeswari, I., Khairul Bariah, S., Amizi, M. A., & Sim, K. Y. (2015). Effects of different fermentation approaches on the microbiological and physicochemical changes during cocoa bean fermentation. *International Food Research Journal*, 22(1), 70–76.
- García-Cáceres, R. G., Perdomo, A., Perdomo, A., Ortiz, O., Ortiz, O., Beltrán, P., Beltrán, P., López, K., & López, K. (2014). Characterization of the supply and value chains of Colombian cocoa. *Dyna*, 81(187), 30–40. <https://doi.org/10.15446/dyna.v81n187.39555>
- Gautier, C., & Marneissel, R. (1998). cerevisiae group based on polymorphisms of rDNA spacer sequences. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 1, 295–303.
- Gavrilova, N. G. (2021). Contemporary global production and consumption of cocoa: An assessment. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, 839(2). <https://doi.org/10.1088/1755-1315/839/2/022095>
- Gerard, L. (2015). Caracterización De Bacterias del ácido acético destinadas a la producción de vinagres de frutas [Universidad politécnica de Valencia]. In *Universidad politécnica de Valencia*.
<https://riunet.upv.es/handle/10251/59401>
- Gorbeña, J. C. R., & Sáenz, T. A. (2017). Bacterias ácido lácticas. *Biotempo*, 8(0), 54–64.
<http://revistas.urp.edu.pe/index.php/Biotempo/article/view/865>
- Guehi, T. S., Zahouli, I. B., Ban-Koffi, L., Fae, M. A., & Nemlin, J. G. (2010). Performance of different drying methods and their effects on the chemical quality attributes of raw cocoa material.

- International Journal of Food Science and Technology*, 45(8), 1564–1571.
<https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2010.02302.x>
- Haile, M., & Kang, W. H. (2019). Isolation, identification, and characterization of pectinolytic yeasts for starter culture in coffee fermentation. *Microorganisms*, 7(10).
<https://doi.org/10.3390/microorganisms7100401>
- Hamdouche, Y., Guehi, T., Durand, N., Kedjebo, K. B. D., Montet, D., & Meile, J. C. (2015). Dynamics of microbial ecology during cocoa fermentation and drying: Towards the identification of molecular markers. *Food Control*, 48, 117–122. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2014.05.031>
- Hashim, H. O., & Al-Shuhaib, M. B. S. (2019). Exploring the potential and limitations of PCR-RFLP and PCR-SSCP for SNP detection: A review. *Journal of Applied Biotechnology Reports*, 6(4), 137–144.
<https://doi.org/10.29252/JABR.06.04.02>
- Hernández-Hernández, C., López-Andrade, P. A., Ramírez-Guillermo, M. A., Guerra Ramírez, D., & Caballero Pérez, J. F. (2016). Evaluation of different fermentation processes for use by small cocoa growers in Mexico. *Food Science and Nutrition*, 4(5), 690–695. <https://doi.org/10.1002/fsn3.333>
- Herrero, E. (2005). Evolutionary relationships between *Saccharomyces cerevisiae* and other fungal species as determined from genome comparisons. *Revista Iberoamericana de Micología*, 22(4), 217–222. [https://doi.org/10.1016/S1130-1406\(05\)70046-2](https://doi.org/10.1016/S1130-1406(05)70046-2)
- Hii, C. L., Abdul Rahman, R., Jinap, S., & Che Man, Y. B. (2006). Quality of cocoa beans dried using a direct solar dryer at different loadings. *Journal of the Science Of Food and Agriculture*, 13(2), 125–135. <https://doi.org/10.1002/jsfa.2475>
- Hii, C. L., Law, C. L., & Cloke, M. (2009). Modeling using a new thin layer drying model and product quality of cocoa. *Journal of Food Engineering*, 90(2), 191–198.
<https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2008.06.022>
- Ho, V. T. T., Fleet, G. H., & Zhao, J. (2018). Unravelling the contribution of lactic acid bacteria and acetic acid bacteria to cocoa fermentation using inoculated organisms. *International Journal of Food Microbiology*, 279, 43–56. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2018.04.040>
- Ho, V. T. T., Zhao, J., & Fleet, G. (2014). Yeasts are essential for cocoa bean fermentation. *International Journal of Food Microbiology*, 174, 72–87. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2013.12.014>
- Ho, V. T. T., Zhao, J., & Fleet, G. (2015). The effect of lactic acid bacteria on cocoa bean fermentation. *International Journal of Food Microbiology*, 205, 54–67.
<https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2015.03.031>
- Hu, S. J., Kim, B. Y., & Baik, M. Y. (2016). Physicochemical properties and antioxidant capacity of raw, roasted and puffed cacao beans. *Food Chemistry*, 194, 1089–1094.
<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.08.126>

- Hughenoltz, J. (1993). Citrate metabolism in lactic acid bacteria. *FEMS Microbiology Reviews*, 12(1–3), 165–178. [https://doi.org/10.1016/0168-6445\(93\)90062-E](https://doi.org/10.1016/0168-6445(93)90062-E)
- Illegghems, K., de Vuyst, L., Papalexandratou, Z., & Weckx, S. (2012). Phylogenetic analysis of a spontaneous cocoa bean fermentation metagenome reveals new insights into its bacterial and fungal community diversity. *PLoS ONE*, 7(5). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0038040>
- Illegghems, K., Pelicaen, R., De Vuyst, L., & Weckx, S. (2016). Assessment of the contribution of cocoa-derived strains of *Acetobacter ghanensis* and *Acetobacter senegalensis* to the cocoa bean fermentation process through a genomic approach. *Food Microbiology*, 58, 68–78. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2016.03.013>
- Jamili, Yanti, N. A., & Susilowati, P. E. (2016). Diversity and the role of yeast in spontaneous cocoa bean fermentation from Southeast Sulawesi, Indonesia. *Biodiversitas*, 17(1), 90–95. <https://doi.org/10.13057/biodiv/d170113>
- Jang, S. J., Lim, S. H., Ko, J. H., Oh, B. H., Kim, S. M., Song, Y. C., Yim, S. M., Lee, Y. W., Choe, Y. B., & Ahn, K. J. (2009). The investigation on the distribution of mcdassezia yeasts on the normal Korean skin by 26S rDNA PCR-RFLP. *Annals of Dermatology*, 21(1), 18–26. <https://doi.org/10.5021/ad.2009.21.1.18>
- Jara, C., Mateo, E., Guillamón, J. M., Mas, A., & Torija, M. J. (2013). Analysis of acetic acid bacteria by different culture-independent techniques in a controlled superficial acetification. *Annals of Microbiology*, 63(1), 393–398. <https://doi.org/10.1007/s13213-012-0450-7>
- Jayaram, V. B., Cuyvers, S., Lagrain, B., Verstrepen, K. J., Delcour, J. A., & Courtin, C. M. (2013). Mapping of *Saccharomyces cerevisiae* metabolites in fermenting wheat straight-dough reveals succinic acid as pH-determining factor. *Food Chemistry*, 136(2), 301–308. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.08.039>
- Jespersen, L., Nielsen, D. S., Hønholt, S., & Jakobsen, M. (2005). Occurrence and diversity of yeasts involved in fermentation of West African cocoa beans. *FEMS Yeast Research*, 5(4–5), 441–453. <https://doi.org/10.1016/j.femsyr.2004.11.002>
- Kadow, D., Bohlmann, J., Phillips, W., & Lieberei, R. (2013). Identification of main fine or flavour components in two genotypes of the cocoa tree (*Theobroma cacao* L.). *Journal of Applied Botany and Food Quality*, 86(1), 90–98. <https://doi.org/10.5073/JABFQ.2013.086.013>
- Kaneuchi, C., Seki, M., & Komagata, K. (1988). Production of Succinic Acid from Citric Acid and Related Acids by *Lactobacillus* Strains. *Applied and Environmental Microbiology*, 54(12), 3053–3056. <https://doi.org/10.1128/aem.54.12.3053-3056.1988>
- Kim, J. H., Shoemaker, S. P., & Mills, D. A. (2009). Relaxed control of sugar utilization in *Lactobacillus brevis*. *Microbiology*, 155(4), 1351–1359. <https://doi.org/10.1099/mic.0.024653-0>

- Kirchmayr, M. R., & Flores, E. (2010). PCR-RFLP de las regiones ITS-5.8S como herramienta de identificación de levaduras: ventajas y desventajas. *Revista Electrónica y Tecnológica E-Gnosis*, 8(January 2019), 1–12.
- Koffi, O., Samagaci, L., Goualie, B., & Niamke, S. (2017). Diversity of Yeasts Involved in Cocoa Fermentation of Six Major Cocoa-Producing Regions in Ivory Coast. *European Scientific Journal, ESJ*, 13(30), 496. <https://doi.org/10.19044/esj.2017.v13n30p496>
- Koné, M. K., Guéhi, S. T., Durand, N., Ban-Koffi, L., Berthiot, L., Tachon, A. F., Brou, K., Boulanger, R., & Montet, D. (2016). Contribution of predominant yeasts to the occurrence of aroma compounds during cocoa bean fermentation. *Food Research International*, 89, 910–917. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2016.04.010>
- Kongor, J. E., Hinnéh, M., de Walle, D. Van, Afoakwa, E. O., Boeckx, P., & Dewettinck, K. (2016). Factors influencing quality variation in cocoa (*Theobroma cacao*) bean flavour profile - A review. *Food Research International*, 82, 44–52. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2016.01.012>
- Kostinek, M., Ban-Koffi, L., Ottah-Atikpo, M., Teniola, D., Schillinger, U., Holzapfel, W. H., & Franz, C. M. A. P. (2008). Diversity of predominant lactic acid bacteria associated with cocoa fermentation in Nigeria. *Current Microbiology*, 56(4), 306–314. <https://doi.org/10.1007/s00284-008-9097-9>
- Krähmer, A., Engel, A., Kadow, D., Ali, N., Umaharan, P., Kroh, L. W., & Schulz, H. (2015). Fast and neat - Determination of biochemical quality parameters in cocoa using near infrared spectroscopy. *Food Chemistry*, 181, 152–159. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.02.084>
- Kratzer, U., Frank, R., Kalbacher, H., Biehl, B., Wöstemeyer, J., & Voigt, J. (2009). Subunit structure of the vicilin-like globular storage protein of cocoa seeds and the origin of cocoa- and chocolate-specific aroma precursors. *Food Chemistry*, 113(4), 903–913. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.08.017>
- Krysiak. (2011). Effects of convective and microwave roasting on the physicochemical properties of cocoa beans and cocoa butter extracted from this material. *Grasas y Aceites*, 62(4), 467–478. <https://doi.org/10.3989/gya.114910>
- Krysiak, W., & Motyl-Patelska, L. (2006). Effects of air parameters on changes in temperature inside roasted cocoa beans. *Acta Agrophysica*, 7(1), 113–127.
- Lagunes-Gálvez, S., Loiseau, G., Paredes, J. L., Barel, M., & Guiraud, J. P. (2007). Study on the microflora and biochemistry of cocoa fermentation in the Dominican Republic. *International Journal of Food Microbiology*, 114(1), 124–130. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2006.10.041>
- Lahtinen, S., Ouwehand, A. C., Salminen, S., & von Wright, A. (2011). Lactic acid bacteria: Microbiological and functional aspects, fourth edition. In *Lactic Acid Bacteria: Microbiological and Functional Aspects, Fourth Edition*. <https://doi.org/10.3920/bm2012.x003>

- Laliberte, B. (2017). International stakeholders ' consultations on the development and validation of proposed international standards on cocoa quality and flavour assessment Reports compiled by Brigitte Laliberte , Cocoa of Excellence Programme Bioversity International , Rome ,. In *Reports Cocoa of Excellence Programme* (Issue October).
- Lasisi, D., & Engineering, B. (2014). A Comparative Study of Effects of Drying Methods on Quality of Cocoa Beans. *International Journal of Engineering Research and Technology*, 3(1), 991–996.
- Leal, G. A., Figueira, A., de Almeida Tavares, F. C., Efraim, P., & Gomes, L. H. (2008). Fermentation of cacao (*Theobroma cacao* L.) seeds with a hybrid *Kluyveromyces marxianus* strain improved product quality attributes. *FEMS Yeast Research*, 8(5), 788–798. <https://doi.org/10.1111/j.1567-1364.2008.00405.x>
- Lefebvre, T., Janssens, M., Camu, N., & De Vuyst, L. (2010). Kinetic analysis of strains of lactic acid bacteria and acetic acid bacteria in cocoa pulp simulation media toward development of a starter culture for cocoa bean fermentation. *Applied and Environmental Microbiology*, 76(23), 7708–7716. <https://doi.org/10.1128/AEM.01206-10>
- Lefebvre, T., Janssens, M., Moens, F., Gobert, W., & De Vuyst, L. (2011). Interesting starter culture strains for controlled cocoa bean fermentation revealed by simulated cocoa pulp fermentations of cocoa-specific lactic acid bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 77(18), 6694–6698. <https://doi.org/10.1128/AEM.00594-11>
- Lefebvre, T., Papalexandratou, Z., Gobert, W., Camu, N., & De Vuyst, L. (2012). On-farm implementation of a starter culture for improved cocoa bean fermentation and its influence on the flavour of chocolates produced thereof. *Food Microbiology*, 30(2), 379–392. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2011.12.021>
- Lima, L. J. R., Almeida, M. H., Rob Nout, M. J., & Zwietering, M. H. (2011). *Theobroma cacao* L., “the food of the gods”: Quality determinants of commercial cocoa beans, with particular reference to the impact of fermentation. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 51(8), 731–761. <https://doi.org/10.1080/10408391003799913>
- Lima, Vaz, A. B., De Castro, G. M., Lobo, F., Solar, R., Rodrigues, C., Soccol, C. R., & Góes-Neto, A. (2021). Integrating microbial metagenomics and physicochemical parameters and a new perspective on starter culture for fine cocoa fermentation. *Food Microbiology*, 93(March 2020). <https://doi.org/10.1016/j.fm.2020.103608>
- Loureiro, G. A. H. A., Araujo, Q. R., Sodré, G. A., Valle, R. R., Souza, J. O., Ramos, E. M. L. S., Comerford, N. B., & Grierson, P. F. (2017). Cacao quality: Highlighting selected attributes. *Food Reviews International*, 33(4), 382–405. <https://doi.org/10.1080/87559129.2016.1175011>
- Loviso, C. L., & Libkind, D. (2018). Synthesis and regulation of flavor compounds derived from brewing

- yeast: Esters. *Revista Argentina de Microbiologia*, 50(4), 436–446.
<https://doi.org/10.1016/j.ram.2017.11.006>
- Magi, E., Bono, L., & Di Carro, M. (2012). Characterization of cocoa liquors by GC-MS and LC-MS/MS: Focus on alkylpyrazines and flavanols. *Journal of Mass Spectrometry*, 47(9), 1191–1197.
<https://doi.org/10.1002/jms.3034>
- Mamlouk, D., & Gullo, M. (2013). Acetic Acid Bacteria: Physiology and Carbon Sources Oxidation. *Indian Journal of Microbiology*, 53(4), 377–384. <https://doi.org/10.1007/s12088-013-0414-z>
- Mancini, A., Lazzi, C., Bernini, V., Neviani, E., & Gatti, M. (2012). Identification of dairy lactic acid bacteria by tRNA^{Ala}-23S rDNA-RFLP. *Journal of Microbiological Methods*, 91(3), 380–390.
<https://doi.org/10.1016/j.mimet.2012.10.003>
- Marseglia, A., Musci, M., Rinaldi, M., Palla, G., & Caligiani, A. (2020). Volatile fingerprint of unroasted and roasted cocoa beans (*Theobroma cacao* L.) from different geographical origins. *Food Research International*, 132(February), 109101. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2020.109101>
- Masoud, W., & Jespersen, L. (2006). Pectin degrading enzymes in yeasts involved in fermentation of *Coffea arabica* in East Africa. *International Journal of Food Microbiology*, 110(3), 291–296.
<https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2006.04.030>
- Mazaheri, Y., Torbati, M., Azadmard-Damirchi, S., & Savage, G. P. (2019). Effect of roasting and microwave pre-treatments of *Nigella sativa* L. seeds on lipase activity and the quality of the oil. *Food Chemistry*, 274(May 2018), 480–486. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.09.001>
- Meersman, E., Steensels, J., Mathawan, M., Wittocx, P. J., Saels, V., Struyf, N., Bernaert, H., Vrancken, G., & Verstrepen, K. J. (2013). Detailed analysis of the microbial population in Malaysian spontaneous cocoa pulp fermentations reveals a core and variable microbiota. *PLoS ONE*, 8(12).
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0081559>
- Meersman, E., Steensels, J., Struyf, N., Paulus, T., Saels, V., Mathawan, M., Allegaert, L., Vrancken, G., & Verstrepen, K. J. (2016). Tuning chocolate flavor through development of thermotolerant *Saccharomyces cerevisiae* starter cultures with increased acetate ester production. *Applied and Environmental Microbiology*, 82(2), 732–746. <https://doi.org/10.1128/AEM.02556-15>
- Meersman, E., Struyf, N., Kyomugasho, C., Jamsazzadeh Kermani, Z., Santiago, J. S., Baert, E., Hemdane, S., Vrancken, G., Verstrepen, K. J., Courtin, C. M., Hendrickx, M., & Steensels, J. (2017). Characterization and Degradation of Pectic Polysaccharides in Cocoa Pulp. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 65(44), 9726–9734. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.7b03854>
- Melo-Ramos, S., Danzl, W., Ziegler, G., & Efraim, P. (2016). Formation of volatile compounds during cupuassu fermentation: Influence of pulp concentration. *Food Research International*, 87, 161–167.
<https://doi.org/10.1016/j.foodres.2016.06.025>

- Mendoza-Salazar, M., Martínez Álvarez, O., Ardila Castañeda, M., & Lizarazo Medina, P. (2022). Bioprospecting of indigenous yeasts involved in cocoa fermentation using sensory and chemical strategies for selecting a starter inoculum. *Food Microbiology*, 101(May 2021). <https://doi.org/10.1016/j.fm.2021.103896>
- Miguel, M. G. da C. P., Reis, L. V. de C., Efraim, P., Santos, C., Lima, N., & Schwan, R. F. (2017). Cocoa fermentation: Microbial identification by MALDI-TOF MS, and sensory evaluation of produced chocolate. *LWT - Food Science and Technology*, 77, 362–369. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2016.11.076>
- MinAgricultura. (2022). *Precio de referencia semanal de compra de cacao - Fuente Industria - FEDECACAO - Exportadores*. <https://www.agronet.gov.co/Noticias/Paginas/Precio-de-referencia-semanal-de-compra-de-cacao---Fuente-Industria.aspx>
- Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural. (2018). Indicadores e Instrumentos. In *MINAGRICULTURA*.
- Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural. (2021). Cadena de valor de Cacao. In *Dirección de cadenas agrícolas y forestales*. [https://sioc.minagricultura.gov.co/Cacao/Documentos/2020-03-31 Cifras Sectoriales.pdf](https://sioc.minagricultura.gov.co/Cacao/Documentos/2020-03-31%20Cifras%20Sectoriales.pdf)
- Mirhendi, H., Makimura, K., Zomorodian, K., Yamada, T., Sugita, T., & Yamaguchi, H. (2005). A simple PCR-RFLP method for identification and differentiation of 11 *Malassezia* species. *Journal of Microbiological Methods*, 61(2), 281–284. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2004.11.016>
- Moens, F., Lefeber, T., & De Vuyst, L. (2014). Oxidation of metabolites highlights the microbial interactions and role of *Acetobacter pasteurianus* during cocoa bean fermentation. *Applied and Environmental Microbiology*, 80(6), 1848–1857. <https://doi.org/10.1128/AEM.03344-13>
- Moreira, I., Costa, J., Vilela, L., Lima, N., Santos, C., & Schwan, R. (2021). Influence of *S. cerevisiae* and *P. kluyveri* as starters on chocolate flavour. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 101(10), 4409–4419. <https://doi.org/10.1002/jsfa.11082>
- Moreira, I., Miguel, M. G. da C., Duarte, W. F., Dias, D. R., & Schwan, R. F. (2013). Microbial succession and the dynamics of metabolites and sugars during the fermentation of three different cocoa (*Theobroma cacao* L.) hybrids. *Food Research International*, 54(1), 9–17. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2013.06.001>
- Moreira, I., Vilela, L., da Cruz Pedroso Miguel, M., Santos, C., Lima, N., & Freitas Schwan, R. (2017). Impact of a Microbial Cocktail Used as a Starter Culture on Cocoa Fermentation and Chocolate Flavor. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 22(5). <https://doi.org/10.3390/molecules22050766>
- Moreira, I., Vilela, L. de F., Santos, C., Lima, N., & Schwan, R. F. (2018). Volatile compounds and protein profiles analyses of fermented cocoa beans and chocolates from different hybrids cultivated

- in Brazil. *Food Research International*, 109(2017), 196–203.
<https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.04.012>
- Mota-Gutierrez, J., Barbosa-Pereira, L., Ferrocino, I., & Cocolin, L. (2019). Traceability of functional volatile compounds and its potential health benefits. *Nutrients*, 11, 23.
<https://doi.org/doi:10.3390/nu11040884>
- Motamayor, J. C., Lachenaud, P., da Silva e Mota, J. W., Loor, R., Kuhn, D. N., Brown, J. S., & Schnell, R. J. (2008). Geographic and genetic population differentiation of the Amazonian chocolate tree (*Theobroma cacao* L.). *PLoS ONE*, 3(10). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0003311>
- Moyer, C. L., Tiedje, J. M., Dobbs, F. C., & Karl, D. M. (1996). A computer-simulated restriction fragment length polymorphism analysis of bacterial small-subunit rRNA genes: Efficacy of selected tetrameric restriction enzymes for studies of microbial diversity in nature. *Applied and Environmental Microbiology*, 62(7), 2501–2507. <https://doi.org/10.1128/aem.62.7.2501-2507.1996>
- Nguyễn, H. V., & Savage, G. P. (2013). The effects of temperature and pH on the extraction of oxalate and pectin from green kiwifruit (*Actinidia deliciosa* L.), golden kiwifruit (*Actinidia chinensis* L.), kiwiberry (*Actinidia arguta*) and persimmon (*Diospyros kaki*). *International Journal of Food Science and Technology*, 48(4), 794–800. <https://doi.org/10.1111/ijfs.12029>
- Nielsen, D., Craack, M., Jespersen, L., & Jakobsen, M. (2013). The Microbiology of Cocoa Fermentation. *Chocolate in Health and Nutrition*, 1–553. <https://doi.org/10.1007/978-1-61779-803-0>
- Nielsen, D. S., Teniola, O. D., Ban-Koffi, L., Owusu, M., Andersson, T. S., & Holzapfel, W. H. (2007). The microbiology of Ghanaian cocoa fermentations analysed using culture-dependent and culture-independent methods. *International Journal of Food Microbiology*, 114(2), 168–186.
<https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2006.09.010>
- Oracz, J., Zyzelewicz, D., & Nebesny, E. (2015). The Content of Polyphenolic Compounds in Cocoa Beans (*Theobroma cacao* L.), Depending on Variety, Growing Region, and Processing Operations: A Review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 55(9), 1176–1192.
<https://doi.org/10.1080/10408398.2012.686934>
- Osorio-Guarín, J. A., Berdugo-Cely, J., Coronado, R. A., Zapata, Y. P., Quintero, C., Gallego-Sánchez, G., & Yockteng, R. (2017). Colombia a source of cacao genetic diversity as revealed by the population structure analysis of germplasm bank of theobroma cacao l. *Frontiers in Plant Science*, 8(November), 1–13. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.01994>
- Ostovar, K., & Keeney, P. G. (1973). Isolation and Characterization in the Fermentation Of Trinidad's Cacao Beans. *Journal of Food Science*, 38(7973), 611–6117.
- Ouattara, Elias, R. J., & Dudley, E. G. (2020). Microbial synergy between *Pichia kudriazevii* YS201 and

- Bacillus subtilis* BS38 improves pulp degradation and aroma production in cocoa pulp simulation medium. *Heliyon*, 6(1). <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2020.e03269>
- Ouattara, H. D., Ouattara, H. G., Droux, M., Reverchon, S., Nasser, W., & Niamke, S. L. (2017). Lactic acid bacteria involved in cocoa beans fermentation from Ivory Coast: Species diversity and citrate lyase production. *International Journal of Food Microbiology*, 256, 11–19. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2017.05.008>
- Ouattara, Koffi, B. L., Karou, G. T., Sangaré, A., Niamke, S. L., & Diopoh, J. K. (2008). Implication of *Bacillus* sp. in the production of pectinolytic enzymes during cocoa fermentation. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 24(9), 1753–1760. <https://doi.org/10.1007/s11274-008-9683-9>
- Ouattara, & Niamké, S. L. (2021). Mapping the functional and strain diversity of the main microbiota involved in cocoa fermentation from Cote d’Ivoire. *Food Microbiology*, 98(February). <https://doi.org/10.1016/j.fm.2021.103767>
- Ouattara, Ouattara, H. G., Goualie, B. G., Kouame, L. M., & Niamke, S. L. (2014). Biochemical and functional properties of lactic acid bacteria isolated from Ivorian cocoa fermenting beans. *Journal of Applied Biosciences*, 77(1), 6489. <https://doi.org/10.4314/jab.v77i1.9>
- Ouattara, Reverchon, S., Niamke, S. L., & Nasser, W. (2011). Molecular identification and pectate lyase production by *Bacillus* strains involved in cocoa fermentation. *Food Microbiology*, 28(1), 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2010.07.020>
- Owusu, M. (2010). Influence of raw material and processing on aroma in chocolate. In *Department of Food Science* (Issue October). https://www.google.com.co/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=4&ved=0ahUKEwip8M-slefKAhUDGR4KHSn7AbwQFggxMAM&url=http://models.life.ku.dk/go-engine?filename=Thesis_Margaret_Owusu.pdf&email=adsdw@sad.de&realname=ssf&country=dk&purpose=Academic&usg=AFQjC
- Owusu, M., Petersen, M. A., & Heimdal, H. (2012). Effect of fermentation method, roasting and conching conditions on the aroma volatiles of dark chocolate. *Journal of Food Processing and Preservation*, 36(5), 446–456. <https://doi.org/10.1111/j.1745-4549.2011.00602.x>
- Papadimitriou, K., Alegría, Á., Bron, P. A., de Angelis, M., Gobbetti, M., Kleerebezem, M., Lemos, J. A., Linares, D. M., Ross, P., Stanton, C., Turroni, F., van Sinderen, D., Varmanen, P., Ventura, M., Zúñiga, M., Tsakalidou, E., & Kok, J. (2016). Stress Physiology of Lactic Acid Bacteria. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 80(3), 837–890. <https://doi.org/10.1128/mmbr.00076-15>
- Papalexandratou, Falony, G., Romanens, E., Jimenez, J. C., Amores, F., Daniel, H. M., & De Vuyst, L. (2011). Species diversity, community dynamics, and metabolite kinetics of the microbiota

- associated with traditional ecuadorian spontaneous cocoa bean fermentations. *Applied and Environmental Microbiology*, 77(21), 7698–7714. <https://doi.org/10.1128/AEM.05523-11>
- Papalexandratou, Z., Vrancken, G., de Bruyne, K., Vandamme, P., & de Vuyst, L. (2011). Spontaneous organic cocoa bean box fermentations in Brazil are characterized by a restricted species diversity of lactic acid bacteria and acetic acid bacteria. *Food Microbiology*, 28(7), 1326–1338. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2011.06.003>
- Páramo, D., García-Alamilla, P., Salgado-Cervantes, M. A., Robles-Olvera, V. J., Rodríguez-Jimenes, G. C., & García-Alvarado, M. A. (2010). Mass transfer of water and volatile fatty acids in cocoa beans during drying. *Journal of Food Engineering*, 99(3), 276–283. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2010.02.028>
- Park, S. H., Jung, J. H., Seo, D. H., Lee, H. L., Kim, G. W., Park, S. Y., Shin, W. C., Hong, S., & Park, C. S. (2012). Differentiation of lactic acid bacteria based on RFLP analysis of the *tuf* gene. *Food Science and Biotechnology*, 21(3), 911–915. <https://doi.org/10.1007/s10068-012-0119-9>
- Parra, R., Puyana, R., & Yepes, F. (2021). *Análisis de la productividad del sector agropecuario en Colombia y su impacto en temas como: encadenamientos productivos, sostenibilidad e internacionalización, en el marco del programa Colombia más competitiva*.
- Passos, F. M. L., Silva, D., Lopez, A., Ferreira, C., & Guimaraes, W. (1984). Characterization and Distribution of Lactic Acid Bacteria from Traditional Cocoa Bean Fermentations in Bahia. *Journal of Food Science*, 49(1), 205–208. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1984.tb13708.x>
- Pelicaen, R., Gonze, D., Teusink, B., De Vuyst, L., & Weckx, S. (2019). Genome-Scale Metabolic Reconstruction of *Acetobacter pasteurianus* 386B, a Candidate Functional Starter Culture for Cocoa Bean Fermentation. *Frontiers in Microbiology*, 10(December). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.02801>
- Pereira, Soccol, V. T., Brar, S. K., Neto, E., & Soccol, C. R. (2017). Microbial ecology and starter culture technology in coffee processing. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 57(13), 2775–2788. <https://doi.org/10.1080/10408398.2015.1067759>
- Pereira, G., Alvarez, J. P., Neto, D. P. D. C., Soccol, V. T., Tanobe, V. O., Rogez, H., & Soccol, C. R. (2017). Great intraspecies diversity of *Pichia kudriavzevii* in cocoa fermentation highlights the importance of yeast strain selection for flavor modulation of cocoa beans. *Lwt*, 84, 290–297. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2017.05.073>
- Pereira, G., De Carvalho Neto, D. P., Junqueira, A. C. D. O., Karp, S. G., Letti, L. A. J., Magalhães Júnior, A. I., & Soccol, C. R. (2020). A Review of Selection Criteria for Starter Culture Development in the Food Fermentation Industry. *Food Reviews International*, 36(2), 135–167. <https://doi.org/10.1080/87559129.2019.1630636>

- Pereira, G., Magalhães, K. T., de Almeida, E. G., da Silva Coelho, I., & Schwan, R. F. (2013). Spontaneous cocoa bean fermentation carried out in a novel-design stainless steel tank: Influence on the dynamics of microbial populations and physical-chemical properties. *International Journal of Food Microbiology*, 161(2), 121–133. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2012.11.018>
- Pereira, G., Miguel, M. G. D. C. P., Ramos, C. L., & Schwan, R. F. (2012). Microbiological and physicochemical characterization of small-scale cocoa fermentations and screening of yeast and bacterial strains to develop a defined starter culture. *Applied and Environmental Microbiology*, 78(15), 5395–5405. <https://doi.org/10.1128/AEM.01144-12>
- Pires, E. J., Teixeira, J. A., & Brányik, T. (2014). Yeast : the soul of beer ’ s aroma — a review of flavour-active esters and higher alcohols produced by the brewing yeast. *Appl Microbiol Biotechnol*, 1937–1949. <https://doi.org/10.1007/s00253-013-5470-0>
- Pitiwittayakul, N., Yukphan, P., Sintuprapa, W., Yamada, Y., & Theeragool, G. (2015). Identification of acetic acid bacteria isolated in Thailand and assigned to the genus *Acetobacter* by groEL gene sequence analysis. *Annals of Microbiology*, 65(3), 1557–1564. <https://doi.org/10.1007/s13213-014-0994-9>
- Poblet, M., Rozès, N., Guillamón, J. M., & Mas, A. (2000). Identification of acetic acid bacteria by restriction fragment length polymorphism analysis of a PCR-amplified fragment of the gene coding for 16S rRNA. *Letters in Applied Microbiology*, 31(1), 63–67. <https://doi.org/10.1046/j.1472-765x.2000.00765.x>
- Porter, T. M., & Brian-Golding, G. (2011). Are similarity- or phylogeny-based methods more appropriate for classifying internal transcribed spacer (ITS) metagenomic amplicons? *New Phytologist*, 192(3), 775–782. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2011.03838.x>
- Procolombia. (2020). *Colombia le apuesta al cacao - Invierta en Colombia*. Fedecacao. <https://www.inviertaencolombia.com.co/revista-virtual/989-colombia-le-apuesta-al-cacao.html>
- Procopio, S., Quian, F., & Beckett, S. T. (2011). Function and regulation of yeast genes involved in higher alcohol and ester metabolism during beverage fermentation. *Eur Food Res Technol*, 721–729. <https://doi.org/10.1007/s00217-011-1567-9>
- Ramli, N., Yatim, A. M., Said, M., & Hok, H. C. (2001). *HPLC Determination of Methylxanthines and Polyphenols Levels In Cocoa and Chocolate Products*. 7(2), 377–386.
- Ramos-Escudero, F., Casimiro-Gonzales, S., Fernández-Prior, Á., Cancino Chávez, K., Gómez-Mendoza, J., Fuente-Carmelino, L. de la, & Muñoz, A. M. (2021). Colour, fatty acids, bioactive compounds, and total antioxidant capacity in commercial cocoa beans (*Theobroma cacao* L.). *Lwt*, 147(May). <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2021.111629>
- Ramos, C. L., Dias, D. R., Miguel, M. G. da C. P., & Schwan, R. F. (2014). Impact of different cocoa

- hybrids (*Theobroma cacao* L.) and *S. cerevisiae* UFLA CA11 inoculation on microbial communities and volatile compounds of cocoa fermentation. *Food Research International*, 64, 908–918.
<https://doi.org/10.1016/j.foodres.2014.08.033>
- Ramos, C. L., Thorsen, L., Schwan, R. F., & Jespersen, L. (2013). Strain-specific probiotics properties of *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus plantarum* and *Lactobacillus brevis* isolates from Brazilian food products. *Food Microbiology*, 36(1), 22–29. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2013.03.010>
- 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>
- Rodriguez-Campos, J., Escalona-Buendía, H. B., Contreras-Ramos, S. M., Orozco-Avila, I., Jaramillo-Flores, E., & Lugo-Cervantes, E. (2012). Effect of fermentation time and drying temperature on volatile compounds in cocoa. *Food Chemistry*, 132(1), 277–288.
<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.10.078>
- Rodriguez-Campos, J., Escalona-Buendía, H. B., Orozco-Avila, I., Lugo-Cervantes, E., & Jaramillo-Flores, M. E. (2011). Dynamics of volatile and non-volatile compounds in cocoa (*Theobroma cacao* L.) during fermentation and drying processes using principal components analysis. *Food Research International*, 44(1), 250–258. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2010.10.028>
- Roelofsen, P. A. (1958). Fermentation, Drying, and Storage of Cacao Beans. *Advances in Food Research*, 8(C), 225–296. [https://doi.org/10.1016/S0065-2628\(08\)60021-X](https://doi.org/10.1016/S0065-2628(08)60021-X)
- Roini, C., Asbirayani Limatahu, N., Mulya Hartati, T., & Sundari. (2019). Characterization of Cocoa Pulp (*Theobroma cacao* L) from South Halmahera as an Alternative Feedstock for Bioethanol Production. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, 276(1). <https://doi.org/10.1088/1755-1315/276/1/012038>
- Romanens, E., Freimüller Leischtfeld, S., Volland, A., Stevens, M., Krähenmann, U., Isele, D., Fischer, B., Meile, L., & Miescher Schwenninger, S. (2019). Screening of lactic acid bacteria and yeast strains to select adapted anti-fungal co-cultures for cocoa bean fermentation. *International Journal of Food Microbiology*, 290(March 2018), 262–272.
<https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2018.10.001>
- Romero-Cortes, T., Cuervo-Parra, J. A., José Robles-Olvera, V., Rangel Cortes, E., & López Pérez, P. A. (2018). Experimental and Kinetic Production of Ethanol Using Mucilage Juice Residues from Cocoa Processing. *International Journal of Chemical Reactor Engineering*, 16(11), 1–16.
<https://doi.org/10.1515/ijcre-2017-0262>
- Ruiz, A., Poblet, M., Mas, A., & Guillamón, J. M. (2000). Identification of acetic acid bacteria by RFLP of PCR-amplified 16S rDNA and 16S-23S rDNA intergenic spacer. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 50(6), 1981–1987. <https://doi.org/10.1099/00207713->

- Salas-Tovar, J. A., Flores-Gallegos, A. C., Contreras-Esquivel, J. C., Escobedo-García, S., Morlett-Chávez, J. A., & Rodríguez-Herrera, R. (2017). Analytical Methods for Pectin Methylesterase Activity Determination: a Review. *Food Analytical Methods*, 10(11), 3634–3646.
<https://doi.org/10.1007/s12161-017-0934-y>
- Samagaci, L., Ouattara, H. G., Goualie, B. G., & Niamke, S. L. (2015). Polyphasic Analysis of Pectinolytic and Stress-Resistant Yeast Strains Isolated From Ivorian Cocoa Fermentation. *Journal of Food Research*, 4(1), 124. <https://doi.org/10.5539/jfr.v4n1p124>
- Samagaci, L., Ouattara, H. G., Goualié, B. G., & Niamke, S. L. (2014). Growth capacity of yeasts potential starter strains under cocoa fermentation stress conditions in Ivory Coast. *Emirates Journal of Food and Agriculture*, 26(10), 861–870. <https://doi.org/10.9755/ejfa.v26i10.18114>
- Samagaci, L., Ouattara, H., Niamké, S., & Lemaire, M. (2016). *Pichia kudrazevii* and *Candida nitrativorans* are the most well-adapted and relevant yeast species fermenting cocoa in Agneby-Tiassa, a local Ivorian cocoa producing region. *Food Research International*, 89, 773–780.
<https://doi.org/10.1016/j.foodres.2016.10.007>
- Sandhya, M. V. S., Yallappa, B. S., Varadaraj, M. C., Puranaik, J., Rao, L. J., Janardhan, P., & Murthy, P. S. (2016). Inoculum of the starter consortia and interactive metabolic process in enhancing quality of cocoa bean (*Theobroma cacao*) fermentation. *LWT - Food Science and Technology*, 65, 731–738.
<https://doi.org/10.1016/j.lwt.2015.09.002>
- Santander-Muñoz, M., Rodríguez Cortina, J., Vaillant, F. E., & Escobar Parra, S. (2020). An overview of the physical and biochemical transformation of cocoa seeds to beans and to chocolate: Flavor formation. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 60(10), 1593–1613.
<https://doi.org/10.1080/10408398.2019.1581726>
- Sarbu, I., & Csutak, O. (2019). The Microbiology of Cocoa Fermentation. In *Caffeinated and Cocoa Based Beverages*. Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-815864-7.00013-1>
- Schoch, C. L., Seifert, K. A., Huhndorf, S., Robert, V., Spouge, J. L., Levesque, C. A., Chen, W., Bolchacova, E., Voigt, K., Crous, P. W., Miller, A. N., Wingfield, M. J., Aime, M. C., An, K. D., Bai, F. Y., Barreto, R. W., Begerow, D., Bergeron, M. J., Blackwell, M., ... Schindel, D. (2012). Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for Fungi. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109(16), 6241–6246. <https://doi.org/10.1073/pnas.1117018109>
- Schwan, R. (1998). Cocoa fermentations conducted with a defined microbial cocktail inoculum. Applied and environmental microbiology. *APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY*, 64(4), 1477–1483. <https://doi.org/00992240-98>

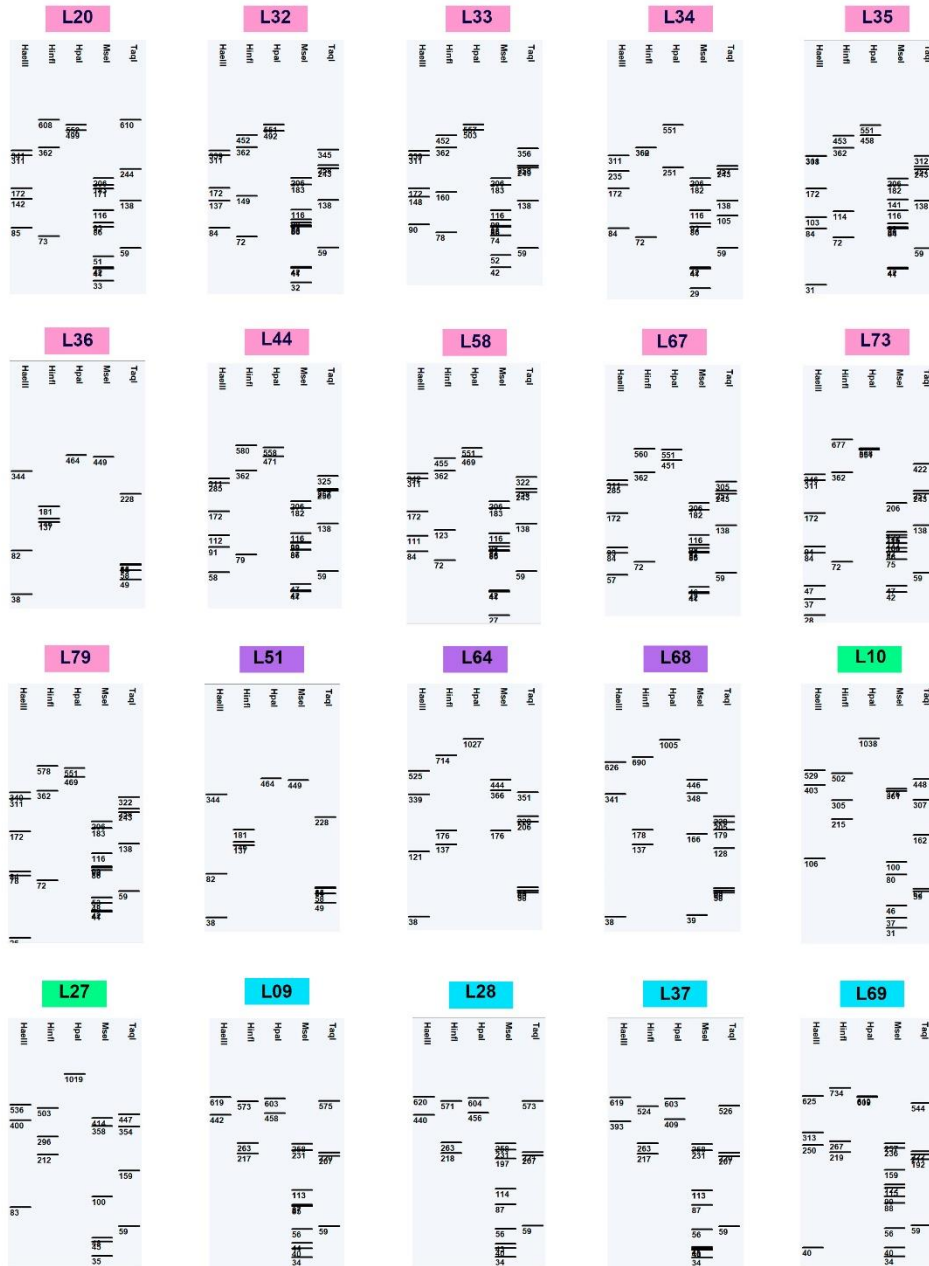
- Schwan, R. F., & Fleet, G. H. (2014). Cocoa and Coffee Fermentations. In T. & F. Group (Ed.), *Fermented Foods and Beverages Series Cocoa*. <https://doi.org/10.1201/b17536>
- Schwan, & Wheals. (2004). The microbiology of cocoa fermentation and its role in chocolate quality. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 44(4), 205–221. <https://doi.org/10.1080/10408690490464104>
- Smid, E. J., & Kleerebezem, M. (2014). Production of aroma compounds in lactic fermentations. *Annual Review of Food Science and Technology*, 5(1), 313–326. <https://doi.org/10.1146/annurev-food-030713-092339>
- Soumahoro, S., Ouattara, H. G., Droux, M., Nasser, W., Niamke, S. L., & Reverchon, S. (2020). Acetic acid bacteria (AAB) involved in cocoa fermentation from Ivory Coast: species diversity and performance in acetic acid production. *Journal of Food Science and Technology*, 57(5), 1904–1916. <https://doi.org/10.1007/s13197-019-04226-2>
- Sukha, D. A., Butler, D. R., Umaharan, P., & Boulton, E. (2008). The use of an optimised organoleptic assessment protocol to describe and quantify different flavour attributes of cocoa liquors made from Ghana and Trinitario beans. *European Food Research and Technology*, 226(3), 405–413. <https://doi.org/10.1007/s00217-006-0551-2>
- Thomas, E., van Zonneveld, M., Loo, J., Hodgkin, T., Galluzzi, G., & van Etten, J. (2012). Present Spatial Diversity Patterns of *Theobroma cacao* L. in the Neotropics Reflect Genetic Differentiation in Pleistocene Refugia Followed by Human-Influenced Dispersal. *PLoS ONE*, 7(10). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0047676>
- Thompson, S. S., Miller, K. B., & Lopez, A. S. (2007). Cocoa and coffee. In M. P. D. and L. R. Beuchat (Ed.), *Food Microbiology fundamentals and frontiers* (Third Edit, Vol. 10, Issue 1). <https://doi.org/10.2436/im.v10i1.9606>
- Todorov, S. D., & de Melo-Franco, B. (2010). *Lactobacillus plantarum*: Characterization of the species and application in food production. *Food Reviews International*, 26(3), 205–229. <https://doi.org/10.1080/87559129.2010.484113>
- Tovar, M. D. L., Tibasosa, G., González, C. M., Alvarez, K. B., & Hernandez, M. D. P. L., Villamizar, F. R. (2020). Isolation and identification of microbial species found in cocoa fermentation as microbial starter culture candidates for cocoa bean fermentation in Colombia. *Pelita Perkebunan (a Coffee and Cocoa Research Journal)*, 36(3), 236–248. <https://doi.org/10.22302/iccri.jur.pelitaperkebunan.v36i3.443>
- Tuenter, E., Delbaere, C., De Winne, A., Bijttebier, S., Custers, D., Foubert, K., Van Durme, J., Messens, K., Dewettinck, K., & Pieters, L. (2020). Non-volatile and volatile composition of West African bulk and Ecuadorian fine-flavor cocoa liquor and chocolate. *Food Research International*,

- 130(December 2019), 108943. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2019.108943>
- Utrilla, M., Rodríguez-Campos, J., Avendaño-Arazate, C. H., Gschaedler, A., & Lugo-Cervantes, E. (2019). Analysis of volatile compounds of five varieties of Maya cocoa during fermentation and drying processes by Venn diagram and PCA. *Food Research International*, 129, 108834. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2019.108834>
- Van Der Meulen, R., Adrian, T., Verbrugghe, K., & De Vuyst, L. (2006). Kinetic analysis of bifidobacterial metabolism reveals a minor role for succinic acid in the regeneration of NAD⁺ through its growth-associated production. *Applied and Environmental Microbiology*, 72(8), 5204–5210. <https://doi.org/10.1128/AEM.00146-06>
- Vanderschueren, R., Montalvo, D., De Ketelaere, B., Delcour, J. A., & Smolders, E. (2019). The elemental composition of chocolates is related to cacao content and origin: A multi-element fingerprinting analysis of single origin chocolates. *Journal of Food Composition and Analysis*, 83(August), 103277. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2019.103277>
- Viesser, J. A., de Melo Pereira, G. V., de Carvalho Neto, D., Rogez, H., Góes-Neto, A., Azevedo, V., Brenig, B., Aburjaile, F., & Soccol, C. R. (2021). Co-culturing fructophilic lactic acid bacteria and yeast enhanced sugar metabolism and aroma formation during cocoa beans fermentation. *International Journal of Food Microbiology*, 339(December 2020). <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2020.109015>
- Viesser, J. A., Pereira, G., de Carvalho Neto, D. P., Vandenberghe, L. P. d. S., Azevedo, V., Brenig, B., Rogez, H., Góes-Neto, A., & Soccol, C. R. (2020). Exploring the contribution of fructophilic lactic acid bacteria to cocoa beans fermentation: Isolation, selection and evaluation. *Food Research International*, 136, 109478. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2020.109478>
- Visintin, S., Ramos, L., Batista, N., Dolci, P., Schwan, F., & Coccolin, L. (2017). Impact of *Saccharomyces cerevisiae* and *Torulaspora delbrueckii* starter cultures on cocoa beans fermentation. *International Journal of Food Microbiology*, 257(2016), 31–40. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2017.06.004>
- Voora, V., Bermúdez, S., & Larrea, C. (2019). Global market report: cocoa. *International Institute for Sustainable Development*, 12. <https://www.iisd.org/library/ssi-global-market-report-cocoa>
- Weather Spark. (2022). *El clima en Sotomayor*. <https://es.weatherspark.com/y/20650/Clima-promedio-en-Sotomayor-Colombia-durante-todo-el-año>
- Wickramasuriya, A. M., & Dunwell, J. M. (2018). Cacao biotechnology: current status and future prospects. *Plant Biotechnology Journal*, 16(1), 4–17. <https://doi.org/10.1111/pbi.12848>
- Wilhelm, H. (2014). *Lactic Acid Bacteria* (L. R. John Wiley & Sons (ed.); first edit). <https://doi.org/10.1002/9781118655252>

- Wollgast, J., & Anklam, E. (2000). Review on polyphenols in *Theobroma cacao*: Changes in composition during the manufacture of chocolate and methodology for identification and quantification. *Food Research International*, 33(6), 423–447. [https://doi.org/10.1016/S0963-9969\(00\)00068-5](https://doi.org/10.1016/S0963-9969(00)00068-5)
- Wood, G. A. ., & Lass, R. . (2001). Cocoa. In B. Science (Ed.), *Cocoa* (Fourth Edi). <https://doi.org/10.1002/9780470698983>
- Xi, Y., Zhan, T., Xu, H., Chen, J., Bi, C., Fan, F., & Zhang, X. (2021). Characterization of JEN family carboxylate transporters from the acid-tolerant yeast *Pichia kudriavzevii* and their applications in succinic acid production. *Microbial Biotechnology*, 14(3), 1130–1147. <https://doi.org/10.1111/1751-7915.13781>
- Yadav, S., Yadav, P. K., Yadav, D., & Yadav, K. D. S. (2009). Pectin lyase: A review. *Process Biochemistry*, 44(1), 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2008.09.012>
- Yamada, Y. (2016). Systematics of Acetic Acid Bacteria. In K. Matsushita, H. Toyama, N. Tonouchi, & A. Kainuma (Eds.), *Acetic Acid Bacteria: Ecology and Physiology*. Springer Japan. https://doi.org/10.1007/978-4-431-55933-7_14
- Youssef, M. M., & Abo-Bakr, T. M. (2019). Effect of Roasting on Physicochemical Properties of Cocoa Beans: An Overview. *Alex. J. Fd. Sci. & Technol*, 16(2), 1–7.
- Yu, J., Sun, Z., Liu, W., Zhang, J., Sun, T., Bao, Q., & Zhang, H. (2009). Rapid identification of lactic acid bacterial isolated from home-made fermented milk in Tibet. *Journal of General and Applied Microbiology*, 55(3), 181–190. <https://doi.org/10.2323/jgam.55.181>
- Zhang, Y., & Vadlani, P. V. (2015). Lactic acid production from biomass-derived sugars via co-fermentation of *Lactobacillus brevis* and *Lactobacillus plantarum*. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 119(6), 694–699. <https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2014.10.027>
- Ziegleder, G. (2009). Flavour Development in Cocoa and Chocolate. *Industrial Chocolate Manufacture and Use: Fourth Edition*, 169–191. <https://doi.org/10.1002/9781444301588.ch8>
- Zyzelewicz, D., Budryn, G., Krysiak, W., Oracz, J., Nebesny, E., & Bojczuk, M. (2014). Influence of roasting conditions on fatty acid composition and oxidative changes of cocoa butter extracted from cocoa bean of Forastero variety cultivated in Togo. *Food Research International*, 63, 328–343. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2014.04.053>
- Zzaman, W., & Yang, T. A. (2013). Effect of superheated steam and convection roasting on changes in physical properties of cocoa bean (*Theobroma cacao*). *Food Science and Technology Research*, 19(2), 181–186. <https://doi.org/10.3136/fstr.19.181>

13. Anexos

Anexo 1. Perfiles de RFLP *in-silico* de LEV con respecto a la región ITS1-5.8S ARNr -ITS2



LEV:

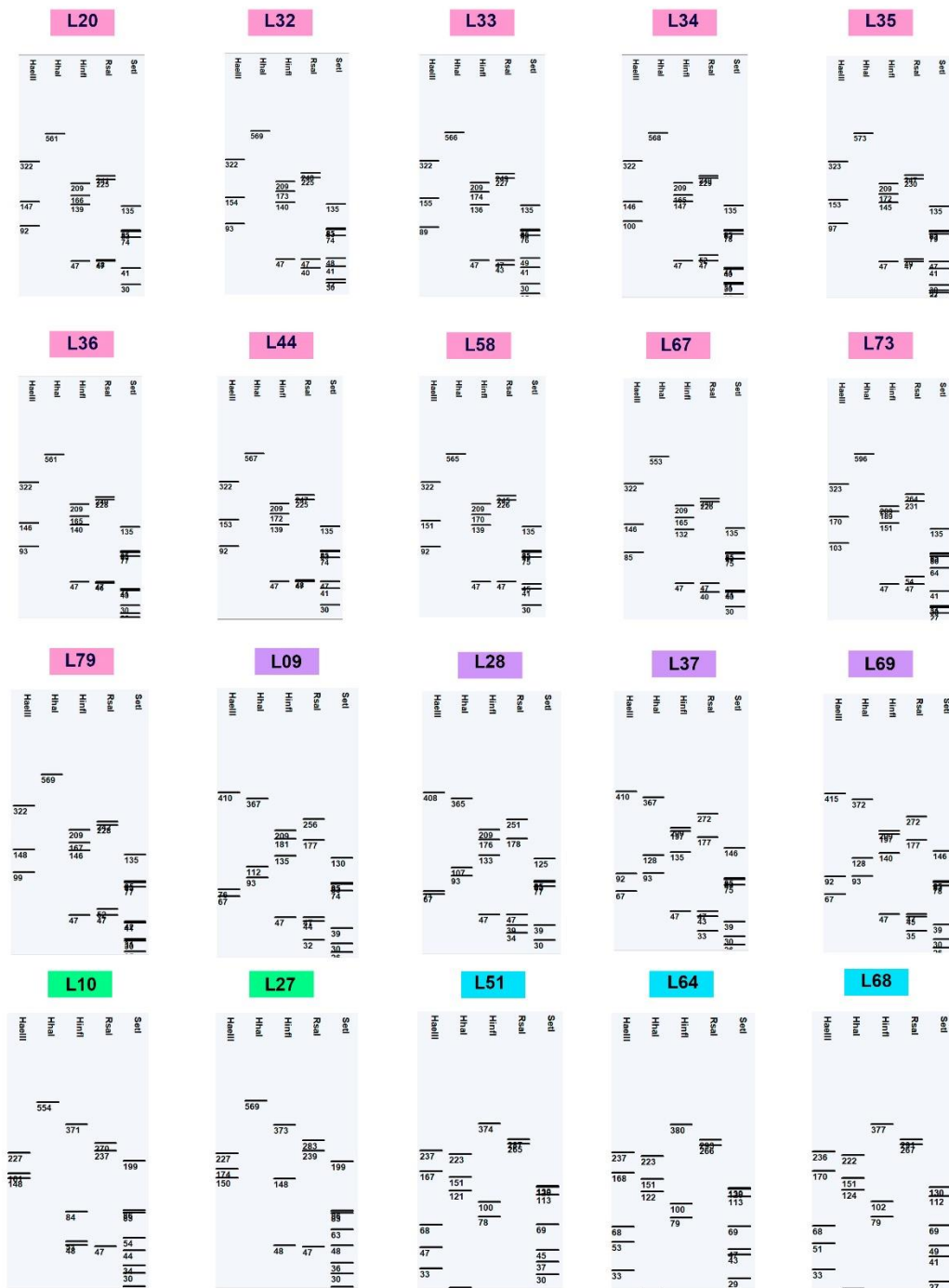
S. cerevisiae

P. kudriavzevii

C. tropicalis

C. glabrata

Anexo 2. Perfiles de RFLP *in-silico* de LEV con respecto a la región D1/D2 ARNr 26S



LEV:

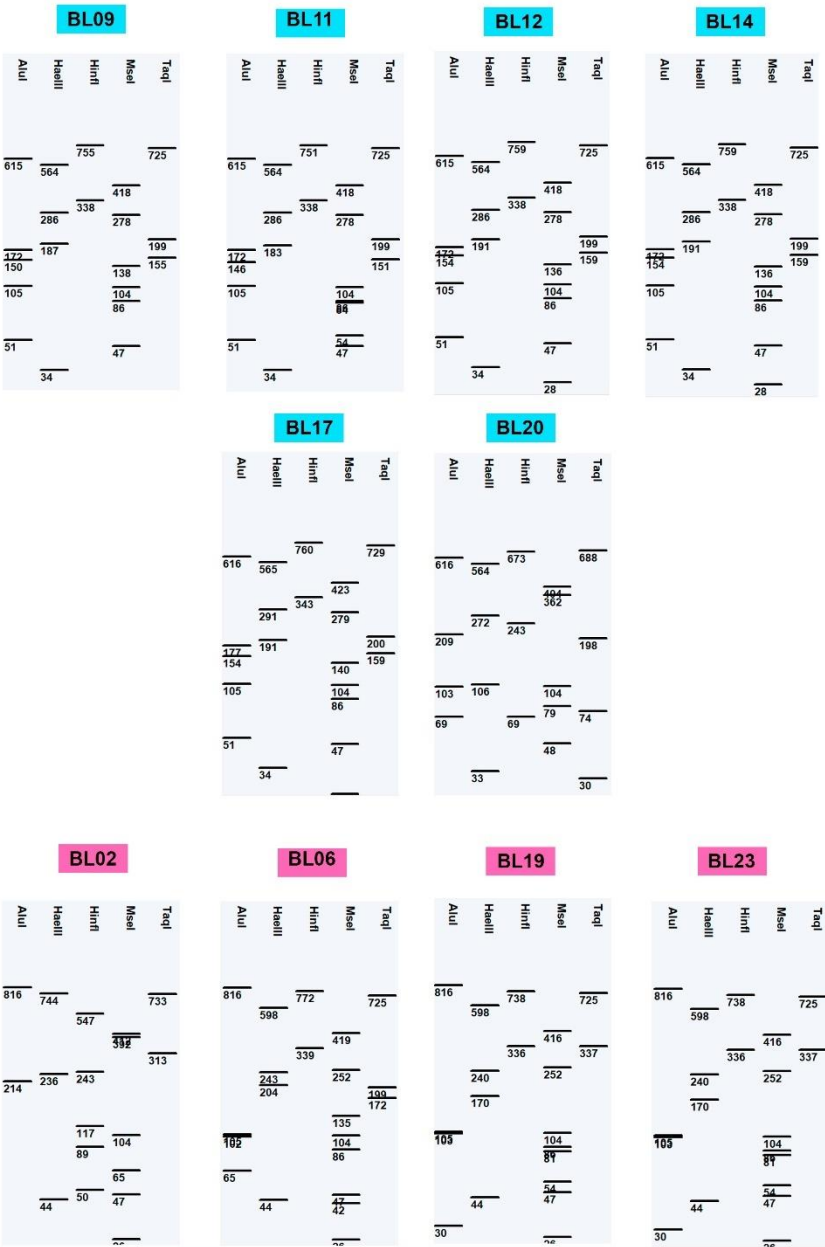
S. cerevisiae

C. glabrata

C. tropicalis

P. kudriavzevii

Anexo 3. Perfiles de RFLP *in-silico* de BAL con respecto a la región 16S ARNr

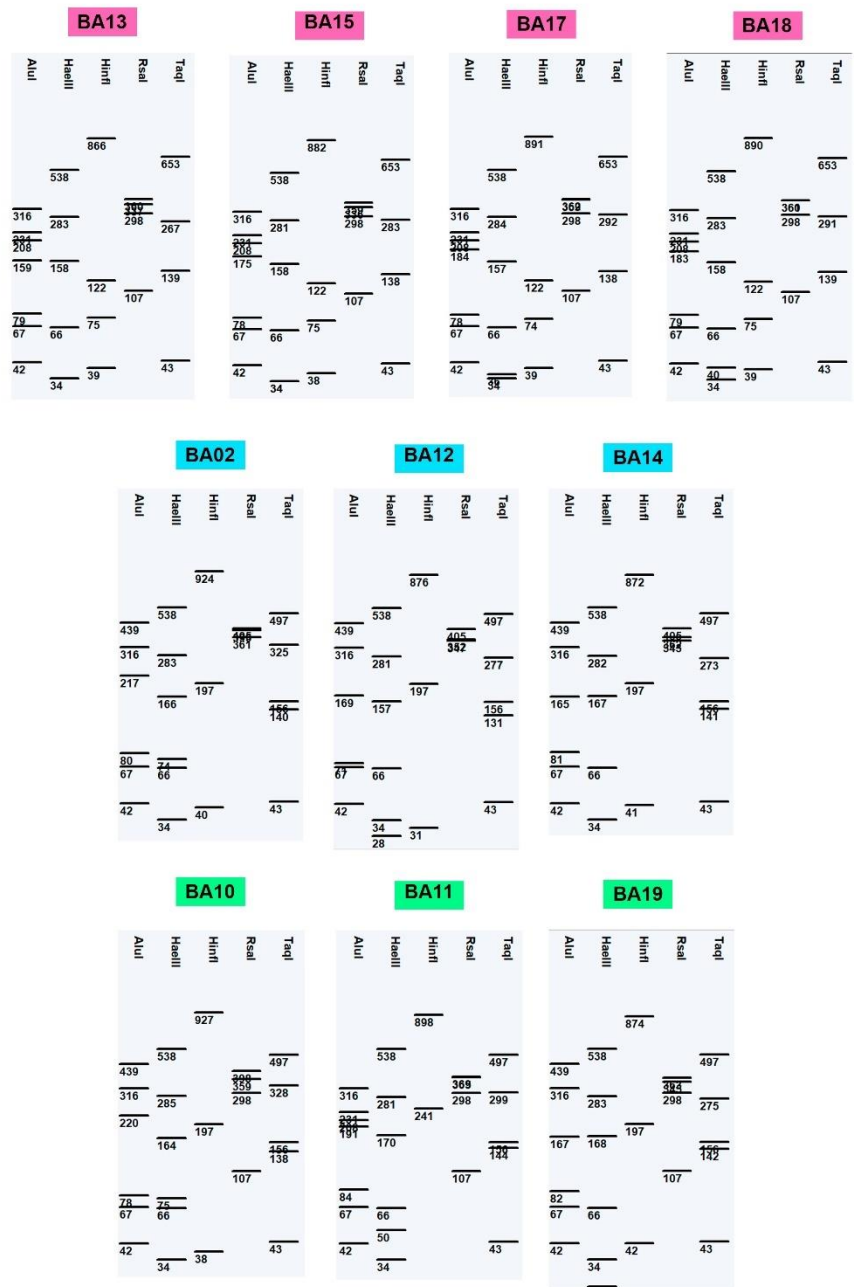


BAL:

L. plantarum

L. brevis

Anexo 4. Perfiles de RFLP *in-silico* de BAA con respecto a la región 16S ARNr



BAA:

A. tropicalis *A. fabarum* *A. okinawensis*