

UNIVERSIDAD NACIONAL
FACULTAD DE CIENCIAS DE LA TIERRA Y EL MAR
ESCUELA DE CIENCIAS AGRARIAS

Levaduras silvestres como cultivos iniciadores en la fermentación controlada y su efecto en el desarrollo de calidades diferenciadas de cacao (*Theobroma cacao L.*)

Trabajo Final de Graduación para optar por el grado de Licenciatura en Ingeniería Agronómica

Modalidad de trabajo de Graduación: Artículo Científico

Estudiantes:

Edgar Eduardo Bermúdez Prendas

José Sánchez Vargas

Tutor:

Carlos Eduardo Hernández Aguirre, PhD

Campus Omar Dengo
Heredia, Costa Rica, 2023

Levaduras silvestres como cultivos iniciadores en la fermentación controlada y su efecto en el desarrollo de calidades diferenciadas de cacao (*Theobroma cacao L.*)

Edgar Eduardo Bermúdez Prendas

José Alberto Sánchez Vargas

Trabajo final de graduación de artículo científico sometida a consideración del tribunal examinador de la Escuela de Ciencias Agrarias para optar por el grado de

Licenciatura en Ingeniería Agronómica

Modalidad de trabajo de Graduación: Artículo Científico

Tribunal Examinador

MSc. Lilliam Quirós Arias

Decana Facultad de Ciencias de la Tierra y el Mar

MSc. Andrés Alpizar Naranjo

Director de la Escuela de Ciencias Agrarias

PhD. Carlos Hernández Aguirre

Tutor Encargado

Bach. Edgar Eduardo Bermúdez Prendas

Sustentante

Bach. Jose Sánchez Vargas

Sustentante

Resumen

El presente trabajo de investigación tiene como objetivo principal mejorar la calidad sensorial del cacao mediante la inoculación de levaduras silvestres durante el proceso de fermentación. Para ello, se capturaron e identificaron levaduras autóctonas del ecosistema circundante y se utilizaron como cultivos iniciadores en un sistema experimental de fermentación controlada. La investigación se enfocó en evaluar la influencia de estas levaduras en la generación de compuestos bioquímicos responsables del perfil sensorial del cacao, tales como ésteres, ácidos orgánicos y metilxantinas, entre otros. Los resultados obtenidos muestran que la utilización de levaduras silvestres seleccionadas puede mejorar significativamente las notas aromáticas y el sabor del cacao, abriendo nuevas oportunidades de diferenciación en el mercado para los productores. Este estudio proporciona una alternativa viable para optimizar el proceso de fermentación del cacao, contribuyendo a la producción de cacaos finos y de aroma con un alto valor agregado

Abstract

The main objective of this research work is to enhance the sensory quality of cocoa by inoculating wild yeasts during the fermentation process. For this purpose, autochthonous yeasts from the surrounding ecosystem were captured and identified, and they were used as starter cultures in an experimental controlled fermentation system. The research focused on evaluating the influence of these yeasts on the generation of biochemical compounds responsible for the sensory profile of cocoa, such as esters, organic acids, and methylxanthines, among others. The results obtained show that the use of selected wild yeasts can significantly improve the aromatic notes and flavor of cocoa, opening up new market differentiation opportunities for producers. This study provides a viable alternative to optimize the cocoa fermentation process, contributing to the production of fine and aromatic cocoa with high added value.

TABLA DE CONTENIDO

1. INTRODUCCIÓN	8
2. OBJETIVOS	10
2.1 OBJETIVO GENERAL	10
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	10
3. MARCO TEÓRICO	11
3.1 Origen del Cacao	11
3.2 Mercado del cacao	11
3.3 Procesos postcosecha de importancia que influyen en la calidad del cacao	12
3.3.1 Fermentación	12
3.3.2 Secado	14
3.4 Levaduras	14
3.4.1 Origen y caracterización de las levaduras	14
3.4.2 Levaduras silvestres como cultivos iniciadores en los procesos de fermentación 15	
3.4.3 Papel de las levaduras en el proceso de fermentación del cacao	16
3.5. Compuestos bioquímicos involucrados en la calidad del cacao	17
4. METODOLOGÍA	18
4.1 Ubicación del estudio	18
4.2 Recolección e inoculación de levaduras silvestres	18
4.3 Sistemas de fermentación controlada	20
4.4 Diseño Experimental	21
4.5 Análisis de GC-MS	22
4.6 Análisis mediante espectrofotómetro de infrarrojo cercano NIR	22
4.7 Análisis de datos	23
5. Resultados	24
5.1 Aislamiento de levaduras silvestres y selección del cultivo iniciador basada en el perfil de compuestos volátiles	24
5.3 Validación del potencial volátil de cultivos iniciadores en pulpa de cacao	25
5.4 Fermentación experimental de cacao con cultivo iniciador basado en levaduras silvestres	29
5.5 Análisis del perfil volátil de cacao fermentado y seco mediante GC-MS	31

5.6 Análisis en NIR	33
6. Conclusiones	35
7. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	36

1. INTRODUCCIÓN

“Fino y de aroma” corresponde a una categoría especial de cacao, reconocido por un perfil de calidad distinguido, que favorece precios diferenciados en el mercado internacional. Aspectos tales como la genética, las prácticas agronómicas y el procesamiento postcosecha son fundamentales en la generación de dichos perfiles de calidad. En particular, la fermentación es uno de los aspectos claves que ha sido ampliamente estudiado en la formación de precursores sensoriales típicos de esta tipología de producto (Díaz-Muñoz & De Vuyst, 2022).

La fermentación es una práctica postcosecha donde participan sucesiones de comunidades microbiológicas, partiendo de la acción de levaduras y bacterias lácticas en la fase anaeróbica, y continuando con procesos aeróbicos dominados por bacterias acéticas (De Vuyst & Weckx, 2016; Díaz-Muñoz et al., 2021). Dichos procesos fermentativos han sido detalladamente revisados por múltiples autores, destacando la complejidad de replicar perfiles sensoriales producto de procesos espontáneos, fomentados por prácticas artesanales. De manera que, ha sido reiterado el esfuerzo en la comunidad científica de estudiar la introducción de cultivos iniciadores basados en la selección de levaduras, hacia la implementación de procesos de fermentación conducentes a la aceleración del proceso y mejora de la calidad del cacao (De Vuyst & Leroy, 2020).

Las levaduras, son microorganismos eucariotas que se encuentran en el ambiente en una serie de sustratos que van desde el suelo, a las cortezas de los árboles y frutas podridas, siendo capaces de fermentar azúcares en presencia limitada de oxígeno (Karim et al., 2020). De acuerdo con varios estudios las levaduras silvestres son llamadas autóctonas o naturales, están determinadas por una variedad de factores ecológicos tales como la ubicación, tipo de suelo, temperatura ambiental, frecuencia de precipitaciones, entre otros.

Las levaduras son responsables de la producción de etanol y otros compuestos que influyen en el desarrollo de la calidad sensorial y organoléptica (Navia & Pazmiño, 2012). Entre los compuestos bioquímicos se da la oxidación de los polifenoles, en particular la disminución de epicatequina y la catequina que se evidencian con una pigmentación marrón

(Santos et al., 2020). Además, se promueven modificaciones en los niveles de compuestos, tales como los alcaloides (cafeína y teobromina), ésteres y ácidos orgánicos, los cuales son indicadores de la calidad organoléptica del cacao (Mendoza Salazar et al., 2022).

La formación de dichos compuestos se da mediante dos etapas: en la primera, las levaduras metabolizan el ácido cítrico y azúcares de la pulpa produciendo etanol y dióxido de carbono, debido a esto el pH y temperatura aumentan permitiendo el crecimiento de bacterias ácido lácticas y ácido acéticas. En la segunda etapa, se da la muerte del embrión en la semilla, debido al aumento de temperatura y a las altas concentraciones de etanol y ácido acético (Mota-Gutierrez et al., 2018).

Las especies de levaduras que predominan en los procesos de fermentación del cacao de forma natural son *Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia kudriavzevii*, *Hanseniaspora opuntiae*, *H. uvarum*, *H. guilliermondii*, *P. manshurica*, *P. kluyveri* y *Candida tropicali* (García Gonzalez et al., 2022). Otros géneros como *Mimbrehamomyces*, *Kluyveromyces*, *Torulaspota* y *Rhodotolura* pueden aparecer en los procesos de fermentación, pero en menor abundancia (Díaz-Muñoz et al., 2023). Sin embargo, *Saccharomyces cerevisiae* conocida como la levadura cervecera o panadera es la levadura más reportada durante la fermentación, debido a su capacidad para producir y tolerar altas concentraciones de etanol, además de azúcares en un medio ácido (Francesca Venturi, 2013).

Este estudio tiene como propósito, la captura e identificación de levaduras silvestres del ecosistema circundante para su propagación y uso como cultivos iniciadores en un sistema experimental de fermentación, en perspectiva de desarrollar tecnologías de manejo poscosecha replicables y conducentes a la producción de cacaos finos y de aroma. Este proyecto proporcionará información útil a los productores de cacao, al brindar una alternativa de descomodificación del proceso de fermentación, que permita diferenciar el producto en el mercado, abriendo oportunidades de comercialización para la obtención de un incremento en el precio, logrando la experiencia de replicar esta estrategia en el campo, con los recursos del ecosistema presentes en las fincas de cada productor.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GENERAL

1. Mejorar la calidad sensorial del cacao mediante la inoculación de levaduras silvestres para ser utilizadas en el proceso de la fermentación del cacao.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Identificar levaduras silvestres con potencial en la producción de notas aromáticas distintivas mediante cromatografía de gases con detector de masas (GC-MS).
2. Determinar la influencia de cultivos iniciadores basados en levaduras silvestres en la calidad de cacao para una diferenciación en las notas formadoras de aroma, sabores y olores precursores del cacao seco.

3. MARCO TEÓRICO

3.1 Origen del Cacao

El cacao (*Theobroma cacao L.*) es un cultivo perenne tropical antiguo de origen selvático en el neotrópico húmedo, que pertenece a la familia Malvácea y al orden Malvales. Este cultivo es de gran importancia histórica y económica para la humanidad, tiene su origen en la zona alta del Amazonas y se remonta a las primeras civilizaciones Olmeca, Tolteca, Maya y Azteca. Desde este centro de origen fue domesticado y dispersado para su consumo y comercio por toda Mesoamérica hace unos 5000 años, por parte de las diferentes culturas prehispánicas. Este jugó un papel importante no solo como un alimento, sino también como moneda, además en temas religiosos y políticos (Díaz-Valderrama et al., 2020).

La región alta amazónica es el centro de mayor diversidad y variabilidad genética del cacao, lo que proporciona una mayor mezcla morfológica y resistencia a enfermedades para la especie. Tradicionalmente se ha clasificado el cacao en tres grupos genéticos diferentes: Forasteros, Criollos y Trinitarios, en donde este último es un híbrido de los individuos Forastero y Criollo (Whitkus et al., 1998).

Actualmente esto ha cambiado y estudios realizados por Motamayor et al., (2008) proponen una clasificación nueva del germoplasma del cacao en 10 grandes grupos y no en tres: Marañón, Curaray, Criollo, Iquitos, Nanay, Contamana, Amelonado, Purús, Nacional y Guayana, los cuales reflejan con mayor precisión la diversidad genética actual.

3.2 Mercado del cacao

Se estima aproximadamente entre 5 a 6 millones de productores de cacao en el mundo y una población de 40 a 50 millones de personas que dependen del cacao para sus ingresos (Beg et al., 2017). La producción anual mundial de cacao alcanza los 4,2 millones de toneladas, con un valor de mercado de \$11,8 mil millones.

La importancia del cacao radica en sus semillas, estas son utilizadas en las industrias de alimentos, cosméticos y farmacéutica. Sin embargo, los granos de cacao sin procesar no son aptos para el consumo debido a su sabor amargo y astringente, además de poseer un gusto desagradable y es necesario un proceso postcosecha para extraer su potencial (De Vuyst & Weckx, 2016).

El principal país productor de cacao es Costa de Marfil y le siguen Ghana, Indonesia, Nigeria, Ecuador, Camerún y Brasil, aunque también se cultiva en otros países de América Latina, África y Asia. Por otra parte, Estados Unidos, México, Países Bajos, Alemania, además de países asiáticos son los mayores importadores de este grano (León J et al., 2016).

El mercado del cacao se divide en dos categorías principales: el cacao fino o aromático que proviene de variedades criollas o trinitarias y el cacao común que proviene de variedades forasteras y abarca el 95 % de producción (Escobar et al., 2021). El mercado de cacao fino ofrece mayores beneficios económicos y sociales para los productores en comparación con el mercado a granel. Por lo tanto, es crucial que los productores de cacao produzcan cacao de alta calidad y estabilidad para poder participar en este mercado en auge (Avalos et al., 2016).

La demanda global de cacao ha experimentado un aumento del 35 % anual según lo previsto para el año 2019, impulsado en parte por la reactivación de mercados de nicho que buscan cacaos finos, orgánicos y de origen específico (Alcívar K, 2021). Una de las principales razones de este crecimiento se debe a la creciente demanda de chocolate en Europa occidental y América del Norte, entre las tendencias que están impulsando este crecimiento se encuentran el chocolate elaborado con cacaos finos de origen único, chocolate premium y negro, así como nuevos sabores (García González et al., 2022).

3.3 Procesos postcosecha de importancia que influyen en la calidad del cacao

3.3.1 Fermentación

Después de la cosecha del fruto, se extrae la semilla en baba para pasar al proceso de fermentación. Se han creado varios sistemas de fermentación para el grano de cacao en todo

el mundo que varían según el país y la región productora, e incluso de un productor a otro (Seijas, 2012).

Estos métodos pueden ser adaptados según el clima, el volumen de producción o los recursos económicos (Nazaruddin et al., 2006). Entre los métodos destacados se encuentran fermentación en pilas, en sacos, en barriles y cajones que pueden ser de madera o plástico. Sin embargo (De Vuyst & Weckx (2016) mencionan que la mayoría del cacao del mundo se fermenta en cajas cubiertas con hojas de plátano o alguna otra musácea.

Durante el proceso de fermentación del cacao, que ocurre de manera espontánea tanto en el interior como en el exterior de la semilla, se generan precursores del sabor y aroma a través de reacciones bioquímicas (Contreras et al., 2004). Estos precursores se completan durante las etapas de secado y tostado.

El proceso de fermentación puede durar entre 4 y 9 días, dependiendo de factores como la concentración de azúcares en la pulpa, la disponibilidad de oxígeno, el pH, la temperatura y la acción de los microorganismos presentes (Rubén et al., 2012). La duración y velocidad de la fermentación están influenciadas por el manejo y la interacción de los factores mencionados. Y este proceso consta de dos fases.

La primera fase es anaeróbica (en ausencia de oxígeno), se caracteriza por la actividad metabólica de levaduras y bacterias ácido lácticas (LAB), las cuales son los primeros grupos microbianos que entran en acción. Los carbohidratos como sacarosa, glucosa y fructosa se consumen junto con el citrato presente en la masa de pulpa de cacao. Además, se degrada la pectina y hay una generación de compuestos como etanol, dióxido de carbono, glicerol. Lactato, también metabolitos de piruvatos que son compuestos de sabor (De Vuyst & Leroy, 2020; Díaz-Muñoz et al., 2021; Kongor et al., 2016; Saltini et al., 2013; Santander Muñoz et al., 2020).

La segunda fase de la fermentación del cacao es aeróbica (en presencia de oxígeno), las bacterias del ácido acético (ABB) oxidan el etanol producido por las levaduras en acetato, lo que genera un aumento de temperatura en la masa de pulpa de cacao debido a los efectos exotérmicos de la fermentación. Esta fase también produce un ligero aumento inicial del pH,

causado por el consumo de citrato en la fase anaeróbica, seguido de una ligera disminución del pH, causada por la producción de acetato durante la fase aeróbica.

La sobre oxidación del acetato puede causar nuevamente un aumento del pH después de una fermentación prolongada. Estos cambios de temperatura y pH, junto con el flujo de etanol y acetato de la pulpa a los granos, son responsables de la muerte del embrión de la semilla y de la activación de enzimas endógenas que contribuyen al sabor y color de los granos de cacao curados, que a su vez influyen en las características de sabor de los chocolates (De Vuyst & Leroy, 2020; Díaz-Muñoz et al., 2021; Kongor et al., 2016; Saltini et al., 2013; Santander Muñoz et al., 2020).

3.3.2 Secado

El secado del cacao es un proceso gradual para reducir la humedad interna del grano a un nivel de entre 7.0 y 8,0 % mediante la aplicación de calor (Dzelagha et al., 2020).

El secado influye en la calidad del grano, Kongor et al. (2016) mencionan que, si la velocidad de secado es demasiado rápida, se corre el riesgo de obtener granos ácidos, mientras que un secado que dure más de 7 días puede provocar la contaminación por diferentes microorganismos.

La forma de secado del grano se puede hacer mediante un método natural o artificial, el secado natural utiliza la radiación solar como fuente de calor, se considera una opción económica, ya que no utiliza combustibles, además, se utilizan diferentes estructuras y superficies que permiten la exposición de los granos al sol y al viento (Barrientos et al., 2019).

Por otra parte, el secado artificial o mecánico es más costoso debido a la necesidad de maquinarias que consumen energía constantemente, pero los costos de mano de obra son menores, ya que los secadores suelen tener mecanismos automatizados para realizar los volteos (Dzelagha et al., 2020).

3.4 Levaduras

3.4.1 Origen y caracterización de las levaduras

Las levaduras son microorganismos unicelulares pertenecientes al reino Fungi. Son ampliamente distribuidas en la naturaleza y desempeñan un papel fundamental en diversos procesos biológicos y ecológicos (Gabaldón, 2020). Su origen se remonta a millones de años atrás, siendo consideradas una de las formas de vida más antiguas de nuestro planeta.

El origen de las levaduras se encuentra estrechamente ligado a la evolución de los hongos, de los cuales son una de las ramas más especializadas. Se estima que surgieron a partir de ancestrales organismos similares a las bacterias, pero con la capacidad de realizar la fermentación y obtener energía a partir de la descomposición de compuestos orgánicos, estas se clasifican en diferentes géneros y especies según su morfología, características bioquímicas y genéticas (Gorter De Vries et al., 2019).

Una de las levaduras más comunes es la del género *Saccharomyces*, dentro de este género se incluyen las especies de levaduras más comunes y utilizadas en la fermentación de la cerveza, el vino y el pan, en donde es la más reconocida y de mayor interés debido a la cantidad de investigaciones. Otro género de levadura es el *Kluyveromyces*, éste incluye especies de levaduras utilizadas en la producción de alimentos; como la *Kluyveromyces lactis*, que se utiliza en la producción de queso (Gallone et al., 2018).

También se encuentra la del género *Pichia* en esta se determinan especies de levaduras utilizadas en la producción de alimentos y bebidas, así como en la producción de proteínas recombinantes para uso farmacéutico (Svedlund et al., 2022). Estos son sólo algunos de los géneros y especies quizás más importantes en la industria agroalimentaria, la taxonomía de las levaduras está en constante evolución esto a medida que se descubren nuevas especies y a su vez se estudian las características genéticas y bioquímicas (Liti et al., 2009).

3.4.2 Levaduras silvestres como cultivos iniciadores en los procesos de fermentación

El uso de levaduras silvestres aisladas en la fermentación del cacao y de otros alimentos se está convirtiendo en una estrategia prometedora para desarrollar cultivos iniciadores. Sin embargo, aún se desconoce mucha información del tema y se han realizado investigaciones

sobre la composición de los compuestos volátiles producidos por estas levaduras (Sandoval-Lozano et al., 2022).

En un estudio realizado por Koné et al. (2016), aislaron levaduras silvestres asociadas a la fermentación espontánea del cacao y se evaluaron los compuestos aromáticos producidos por estas especies de levaduras. Los investigadores, identificaron una variedad de compuestos volátiles que tienen el potencial de tener un impacto significativo en las cualidades sensoriales del licor de cacao y el chocolate.

Otro ejemplo de una investigación en vinos determinó que el uso de cepas autóctonas en la producción de vinos puede resultar en características organolépticas excepcionales y un carácter local distintivo, superando en calidad a las cepas comerciales (Parapouli et al., 2019). Sin embargo, aún existe incertidumbre y falta de comprensión sobre la relación entre estos genotipos de cepas silvestres, asociados a compuestos específicos, y los perfiles biosintéticos de los metabolitos del sabor.

3.4.3 Papel de las levaduras en el proceso de fermentación del cacao

Las levaduras desempeñan un papel fundamental en la transformación de los azúcares presentes en las semillas en alcohol y otros procesos metabólicos (Ferreira et al., 2017). Esto influye en el sabor y aroma del cacao, este proceso de fermentación también ayuda a eliminar algunos compuestos indeseables y reduce la acidez de las semillas. Además, las levaduras pueden mejorar la eficiencia de la fermentación al facilitar la liberación de los lípidos y polifenoles presentes en las semillas, lo que puede mejorar la calidad del producto final (Feng et al., 2020).

Para lograr estos efectos, las levaduras utilizan varios mecanismos de acción, incluyendo la producción de enzimas como las amilasas y las proteasas, que descomponen los carbohidratos y las proteínas en la semilla de cacao en componentes más simples que pueden ser utilizados para su crecimiento y producción de metabolitos secundarios, además, las levaduras también pueden producir ácidos orgánicos, como el ácido láctico y el ácido acético, que reducen el pH de la mezcla de fermentación y crean un ambiente menos favorable para otros microorganismos no deseables (de Celis et al., 2022).

No obstante, para implementar levaduras en un modelo de fermentación de cacao, es necesario seleccionar cepas adecuadas y optimizar las condiciones de fermentación, como la temperatura, el pH y el tiempo de fermentación, para obtener los mejores resultados (Liti et al., 2009). En un sistema de fermentación controlada, se observan cuidadosamente las condiciones ambientales como: la temperatura, la concentración de oxígeno y la acidez, para garantizar que las levaduras trabajen de manera óptima y produzcan los efectos deseados en la cantidad y calidad de los productos finales (Dimidi et al., 2019).

3.5. Compuestos bioquímicos involucrados en la calidad del cacao

Durante el proceso de fermentación los polifenoles disminuyen, por el proceso de difusión y oxidación, es importante porque los polifenoles le dan al cacao su sabor amargo y astringente influyendo en la calidad de este (Peña-Correa et al., 2022). En su contenido de teobromina y cafeína, las cuales son sustancias alcaloides que se encuentran en el cacao, y durante este proceso de fermentación la concentración de estas sustancias disminuye aproximadamente en un 20-25%, un aspecto muy importante a tomar en cuenta es que la relación entre la teobromina y cafeína puede ayudar a distinguir el origen del cacao (Escobar et al., 2021).

La teobromina, la cafeína y epicatequina son compuestos químicos presentes en el cacao y tienen un papel importante en el proceso de fermentación, debido a que, durante la fermentación del cacao, las semillas de cacao se someten a un proceso de fermentación microbiana en el que los microorganismos presentes en el ambiente descomponen los azúcares y otros compuestos presentes en las semillas. En estos procesos compuestos como la teobromina, la cafeína y epicatequina se ven afectados y transformados por los microorganismos presentes y esto tiene un impacto en las propiedades organolépticas del cacao fermentado como su sabor y aroma (Fernández-Niño et al., 2021).

4. METODOLOGÍA

4.1 Ubicación del estudio

Los sistemas de fermentación controlada y secado se instalaron en la Finca Experimental Santa Lucia de Barva perteneciente a la Universidad Nacional de Costa Rica, ubicada en el distrito de Santa Lucia, cantón de Barva, de la provincia de Heredia, a 1200 m.s.n.m., coordenadas 10° 01' latitud norte y 84° 06' longitud oeste, con una temperatura promedio de 21.5° C, humedad relativa del 78 % y una precipitación anual de 2371 mm.

4.2 Recolección e inoculación de levaduras silvestres

Para la recolección de las levaduras silvestres, se eligieron ubicaciones adecuadas dentro de La Finca Santa Lucia que representen el ecosistema de levaduras, como cultivos, huertos, bosque u otra área natural. Las muestras se recolectaron de diferentes fuentes, como flores, frutas, en las que se sospeche la presencia de levaduras silvestres. Se recolectaron levaduras de 10 sustratos diferentes.

Para aislar las levaduras, al sustrato seleccionado se le añadieron 225 ml de agua con solución salina-peptona (0,1 % [vol / vol] de peptona bacteriológica [Himedia], 0,8 % [vol / vol] de NaCl [Merck, Whitehouse Station, NJ]) y se homogenizaron en un Stomacher a velocidad normal durante 5 min, seguido por 6 diluciones seriadas.

La solución salina-peptona de las disoluciones 5 y 6 conteniendo las levaduras silvestres se inoculó en platos Petri con medio agar YEPG (2 % agar [Merck], 1 % de extracto de levadura [Merck], 2 % de peptona [Himedia], 2 % de glucosa [Merck] [pH 5,6]), usándose 100 mg / litro de cloranfenicol (Sigma) para inhibir el crecimiento bacteriano. Posterior a la inoculación, las placas se incubaron a 30 °C durante un tiempo de 3 a 4 días para el crecimiento de los cultivos (Figura 1). Luego, se identificaron colonias de levaduras aisladas, las cuales fueron inoculadas nuevamente en placas Petri con medio agar YEPG. Para esto, se tomó un pequeño fragmento de la colonia con un asa y se colocó en un nuevo plato Petri, el cual se incubó nuevamente a 30 °C durante 3 a 4 días, obteniéndose así colonias puras.

Los cultivos de levaduras puras fueron inoculados tomando un pequeño fragmento de la colonia con un asa en tubos de ensayo con 10 ml de medio YEPG (1 % de extracto de levadura [Merck], 2 % de peptona [Himedia], 2 % de glucosa [Merck] [pH 5,6]), usándose 100 mg / litro de cloranfenicol (Sigma), se incubaron a 30 °C durante 48 horas.

Los cultivos de levaduras también fueron inoculados en un medio de pulpa de cacao pasteurizada; se utilizaron métodos publicados con modificaciones (Bicket Haase et al, 2023). La pulpa fue pasteurizada mediante calentamiento sobre plantilla eléctrica, utilizándose 350 ml a una temperatura de 70 °C durante 15 minutos. Posteriormente se colocó en tubos de ensayo 10 ml de pulpa y se pasaron a un congelador durante 5 minutos para su enfriamiento (Figura 2). Las levaduras se cultivaron dentro de los tubos utilizándose la pulpa pasteurizada para la evaluación del potencial volátil mediante GC-MS.



Figura 1. Colonias de levaduras silvestres aisladas.



Figura 2. Pulpa pasteurizada en baño frío.

4.3 Sistemas de fermentación controlada

Los sistemas de fermentación controlada consistieron en cajones de madera de Laurel con medidas de 30 cm de ancho x 40 cm de alto x 6 cm de espesor, con capacidad para lotes de 60 kg. Dichos cajones fueron lavados y adecuados con los orificios para la correcta salida del lixiviado de la pulpa durante el proceso de fermentación que tuvo una duración de 6 días.

La extracción de las semillas se realizó mediante cortes longitudinales de las mazorcas, atravesando el mesocarpo. Se procedió a extraer las semillas, dejando de lado la vena central.

Se implementaron prácticas de poscosecha necesarias para generar la sucesión de las fases anaeróbica durante las primeras 48 horas, y posteriormente aeróbica, mediante volteos cada 24 horas. El proceso fue evaluado mediante pruebas de corte de muestras de 25 granos en cada volteo.

Al finalizar la fermentación la masa fermentada fue extendida en camas elaboradas con tablones de madera de laurel de 4 m de largo por 3 m de ancho, a una altura de 70 cm del suelo. Se implementó un secado mediante el aprovechamiento de la radiación solar directa, en combinación con un techado en plástico para proteger las semillas de posibles lluvias, en un proceso de 9 días, hasta alcanzar un grado de humedad interna del grano cercano al 7 %.

Durante el proceso de fermentación y secado, se registraron los parámetros de temperatura y pH a intervalos de 24 horas.

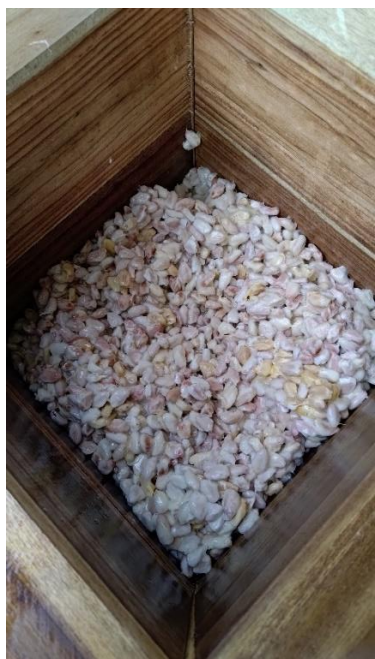


Figura 3. Cajones fermentadores de cacao.

4.4 Diseño Experimental

En la primera fase, se cultivaron 18 levaduras silvestres en medio YEPG durante 48 horas a 30 °C. En la segunda fase, se seleccionaron 3 de las levaduras iniciales y se cultivaron en medio de pulpa de cacao pasteurizada durante 48 horas a 30 °C, con tres réplicas por levadura, y un testigo de solo pulpa de cacao pasteurizada, también con tres réplicas.

Para la evaluación del cultivo iniciador en fermentación de granos de cacao, basado en levaduras silvestres, se realizó un enfoque completamente aleatorizado con dos tratamientos diferentes: un control sin inoculación de levaduras (fermentación espontánea) y un tratamiento con inoculación de una mezcla de levaduras silvestres seleccionadas mediante la adición de 100 ml de suspensión de la levadura en una concentración celular de 10^6 UFC/ml. Las fermentaciones se realizaron en los sistemas de fermentación controlada.

4.5 Análisis de GC-MS

El análisis de compuestos volátiles por efecto de la inoculación de levaduras silvestres se llevó a cabo mediante el método de microextracción en fase sólida (SPME) y GC-MS, siguiendo los protocolos descritos por Rottiers et al. (2019) con algunas modificaciones.

En una primera fase se evaluó el potencial volátil de levaduras en medio YEPG, en viales de vidrio, tomándose 2 g de medio en proceso de fermentación. En una segunda fase se evaluó el potencial volátil de levaduras en pulpa de cacao pasteurizada, en viales de vidrio, tomándose 2 g de medio en proceso de fermentación. En una tercera fase se evaluaron muestras de 2 g de granos de cacao secos macerados. Los viales fueron sellados y sometidos a microextracción en fase sólida con espacio de cabeza (HS-SPME) utilizando una fibra de sílice fusionada con polidimetilsiloxano (PDMS) de 100 μm . La fibra se acondicionó en el inyector del cromatógrafo a 250 °C durante 4 min, luego se expuso al espacio de cabeza para la absorción de volátiles durante 30 min a 60 °C.

Los compuestos volátiles fueron analizados utilizando un cromatógrafo de gases Agilent Technologies 7890B acoplado a un detector de masas (MS) Agilent 5977A y el software Agilent MassHunter Acquisition. Se utilizó una columna capilar Agilent DB-5ms. El gas portador utilizado fue helio a un caudal de 1 mL/min. Las muestras de HS-SPME se inyectaron en modo splitless a una temperatura de 250 °C, y la fibra de SPME se desorbió durante 5 minutos. La temperatura inicial del horno del cromatógrafo de gases se fijó en 40 °C y se mantuvo durante 5 minutos. Luego, la temperatura se aumentó a 200 °C a una velocidad de 10 °C por minuto y se mantuvo durante 20 minutos.

Se realizó la identificación de los volátiles mediante la comparación de sus espectros de masas con una base de datos del NIST. La cuantificación relativa se realizó mediante la integración de las áreas de los picos de los compuestos identificados utilizando el software MSD Chemstation (Agilent Technologies).

4.6 Análisis mediante espectrofotómetro de infrarrojo cercano NIR

Se recolectaron 250 g de cacao del tratamiento y del control cada día de secado, se siguió el procedimiento de (Quesada, (2024), cuyo artículo se encuentra en proceso de publicación

para análisis mediante espectrofotómetro de infrarrojo cercano NIR ProxiMate (BÜCHI, Suiza). Se procesaron 50 gramos de granos enteros en una licuadora durante 45 segundos, distribuidos en tres intervalos de licuado de cinco segundos cada uno, con pausas de 10 segundos entre cada intervalo, utilizando la intensidad mínima. No se llevó a cabo el descascarillado de los granos ni se tamizó el polvo resultante del licuado. Se colocaron 10 gramos de cacao para obtener los espectros según la vista superior del equipo.

El espectro de cada muestra se obtuvo utilizando un espectrofotómetro de infrarrojo cercano NIR ProxiMate (BÜCHI, Suiza). Todas las muestras fueron procesadas en modo rotatorio durante 15 segundos, con escaneos que abarcaron un rango de espectro de luz visible + NIR (400 - 1700 nm) con una resolución de dos nanómetros (650 puntos). El espectrómetro portátil proporcionó las medidas en partes de absorbancia proporcionales ($\log 1/R$), donde R representa la reflectancia. Con el NIR se determinaron los siguientes parámetros: acidez total, humedad, grasa, proteína, cenizas, cafeína, teobromina, epicatequina, color_a, color_b y color_L.

4.7 Análisis de datos

Para el análisis de los datos (áreas de absorbancia de GC MS) se aplicaron técnicas de normalización de datos en el rango de 0 a 1, con el fin de facilitar la comparación entre las diferentes variables medidas. Se utilizó la fórmula Valor Normalizado = $(\text{valor} - \text{valor mínimo}) / (\text{valor máximo} - \text{valor mínimo})$.

5. Resultados

5.1 Aislamiento de levaduras silvestres y selección del cultivo iniciador basada en el perfil de compuestos volátiles

Se aislaron levaduras silvestres a partir de frutos o flores de las especies vegetales Guayaba (*Psidium guajava*), Pitahaya (*Hylocereus spp*), Naranja (*Citrus sinensis*), Níspero (*Eriobotrya japonica*), Mango (*Mangifera indica*), Manzana de Agua (*Syzygium aqueum*) y Algodón (*Gossypium spp.*). Se obtuvieron 18 colonias y se cultivaron en medio líquido.

Se determinaron los perfiles volátiles mediante GC MS a las 48 horas de crecimiento de las levaduras en medio cultivo YEPG líquido. Se identificaron y cuantificaron diversos compuestos, entre los que destacan ésteres, alcoholes, cetonas, y ácidos orgánicos, (Cuadro 1). Las áreas del cromatograma fueron transformadas en valores normalizados entre 0 y 1, para facilitar el criterio de selección de levaduras con mayor complejidad en la producción potencial de compuestos volátiles.

Según Sandoval-Lozano, et al. (2022) se observó la presencia de etanol, acetato de etilo, isobutanol, ácido acético, 2-pentanol acetato y alcohol fenético en diferentes niveles. Estos compuestos son importantes debido a sus roles en la formación de aromas asociados a descriptores de calidad de cacao finos, tal y como ha sido descrito de forma similar en publicaciones recientes.

Los diferentes cultivos presentaron niveles variados de compuestos volátiles, reflejando la diversidad metabólica de las levaduras aisladas. El cultivo iniciador 16d (originado en frutos de mango) destacó por su potencial para la producción de etanol (Tabla 1) mientras que el cultivo 18d (originado en frutos de guayaba) sobresalió por su potencial en la producción de acetato de etilo. El cultivo 17d destacó por el mayor contenido de isobutanol, mientras que el cultivo 5d encabezó en la producción de 2-pentanol acetato. Finalmente, el cultivo 21d obtuvo el mayor contenido de alcohol fenético.

Tabla 1. Compuestos volátiles dominantes en cultivos de levaduras silvestres, en medio de cultivo YEPG.

Destino	ID Muestra	Compuesto y Tiempo de Retención (s)					
		Etanol	Acetato de etilo	Isobutanol	Ácido Acético	2 Pentanol acetato	Alcohol fenilico
		10.2	18.1	19.1	19.7	42.1	64.2
pitahaya	1d	0.0	0.5	0.0	1.0	0.0	0.0
naranja	2d	0.0	0.1	0.0	0.0	0.0	0.0
naranja	3d	0.0	0.9	0.0	0.0	0.4	0.0
mango	4d	0.0	0.3	0.0	0.0	0.0	0.0
pitahaya	5d	0.1	0.3	0.0	0.0	1.0	0.0
mango	10d	0.0	0.2	0.0	0.0	0.3	0.0
mango	16d	1.0	0.3	0.0	0.0	0.0	0.0
mango	17d	0.8	0.3	1.0	0.0	0.2	0.0
guayaba	18d	0.9	1.0	0.0	0.0	0.0	0.0
pitahaya	19d	0.0	0.7	0.0	0.5	0.0	0.7
pitahaya	20d	0.4	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
m. agua	21d	0.8	0.5	0.0	0.0	0.0	1.0
m. agua	22d	0.7	0.5	0.6	0.0	0.0	0.3
m. agua	23d	0.0	0.4	0.0	0.0	0.0	0.0
m. agua	24d	0.8	0.0	0.0	0.0	0.0	0.9
níspero	25d	0.3	0.4	0.0	0.0	0.0	0.4
níspero	27d	0.9	0.0	0.0	0.0	0.0	0.5
algodón	29d	0.0	0.4	0.0	0.0	0.0	0.0

5.3 Validación del potencial volátil de cultivos iniciadores en pulpa de cacao.

En una segunda fase se validó el potencial como cultivos iniciadores para los cultivos seleccionados 1d (asociado al mayor contenido de ácido acético) y 18d (asociado con altos

contenidos de etanol y acetato de etilo). En esta fase se incluyó también el cultivo 4d que no destacó en ninguno de los indicadores estudiados. Se evaluaron los cultivos seleccionados en pulpa de cacao pasteurizada, con 3 replicados y un testigo con sus replicados.

Se observó la aparición de compuestos no visualizados en el medio de cultivo líquido en la fase previa, tales como el 1-butanol-3-metilo y el acetato de pentilo (Tabla 2). Dichos compuestos son relevantes por sus contribuciones a los perfiles aromáticos y de sabor, tal y como ha sido descrito previamente (Bicket Haase et al, 2023).

Se obtuvieron perfiles distintivos en la producción de volátiles según el cultivo iniciador utilizado, lo cual fue consistente con las observaciones en la primera fase, utilizándose medio de cultivo YEPG. Por ejemplo, en el cultivo 1d, destacaron mayores concentraciones de acetato de etilo y acetato de 2-pentanol, de manera consistente en todas las réplicas (1dA, 1dB y 1dC). Mientras que en el cultivo 4d, se observaron concentraciones elevadas de acetato de etilo (Tabla 2).

Para el cultivo 18d se registraron concentraciones significativas de acetato de etilo y 1-pentanol. Mientras que los testigos mostraron concentraciones bajas de compuestos aromáticos en comparación con los cultivos de levaduras en pulpa de cacao.

Tabla 2. Compuestos volátiles dominantes en cultivos de levaduras silvestres utilizadas en la fermentación de pulpa de cacao.

ID Muestra	Compuesto y Tiempo de Retención (s)				
	Etanol	Acetato de etilo	1-Butanol, 3-metil	acetato de pentilo	2-pentanol acetato de
	10.2	18.1	28.9	39.4	42.1
1dA	0.2	0.1	0.4	0.0	1.0
1dB	0.1	0.0	0.2	0.4	0.8
1dC	0.2	0.1	0.3	0.6	1.0
4dA	0.3	0.4	0.4	0.0	0.0
4dB	0.3	0.4	0.6	0.0	0.1
4dC	0.3	0.3	0.5	0.0	0.0
18dA	1.0	0.6	0.7	1.0	0.1
18dB	0.4	0.4	0.6	0.5	0.1
18dC	1.0	1.0	1.0	0.8	0.1
1testigo	0.0	0.0	0.0	0.5	0.0
2testigo	0.0	0.0	0.0	1.0	0.0
3testigo	0.0	0.0	0.0	0.4	0.0

Cada cultivo iniciador basado en el uso de levaduras silvestres para la fermentación de pulpa de cacao evidencia perfiles diferenciados por compuestos volátiles asociados a descriptores de calidad aromática reconocidos en la literatura científica (CITAS). Dichos perfiles volátiles se observan en los gráficos de GC MS en Figuras 5-8.

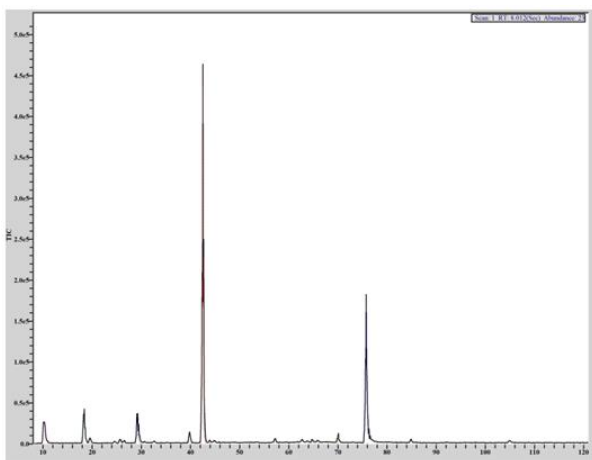


Figura 4. Perfil volátil basado en SPME-GC MS para el cultivo 1d A.

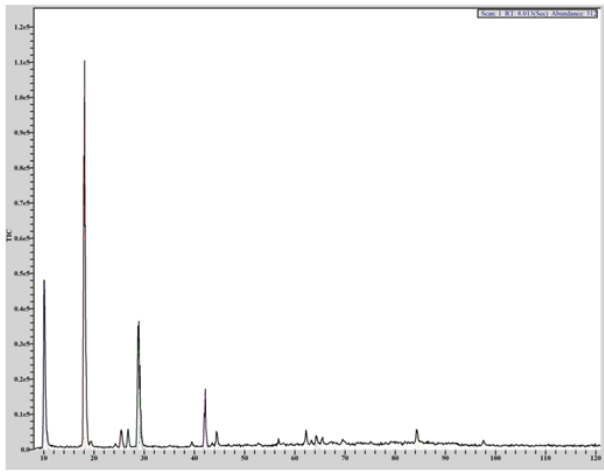


Figura 5. Perfil volátil basado en SPME-GC MS para el cultivo 4d A.

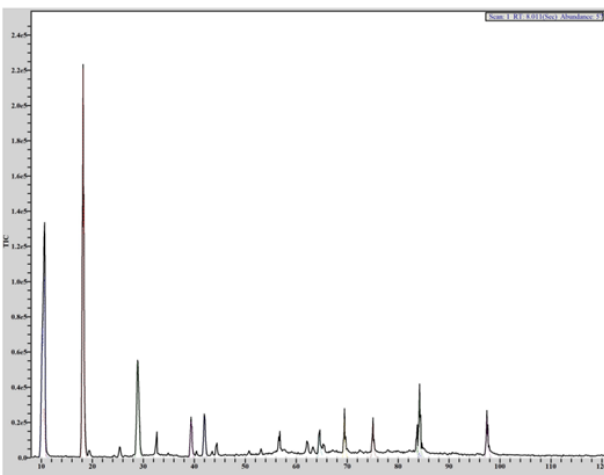


Figura 6. Perfil volátil basado en SPME-GC MS para el cultivo 18d A.

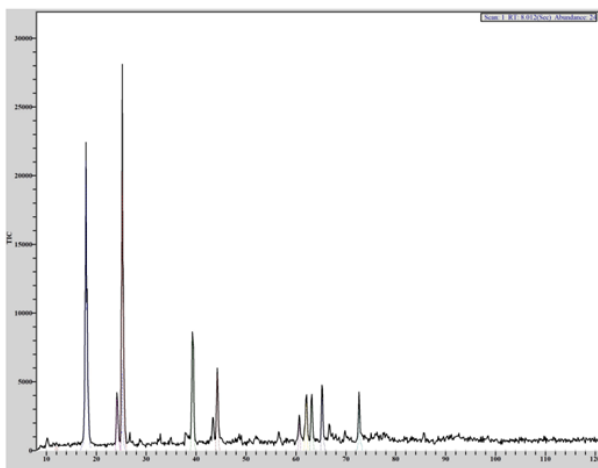


Figura 7. Perfil volátil basado en SPME-GC MS para el cultivo Testigo A.

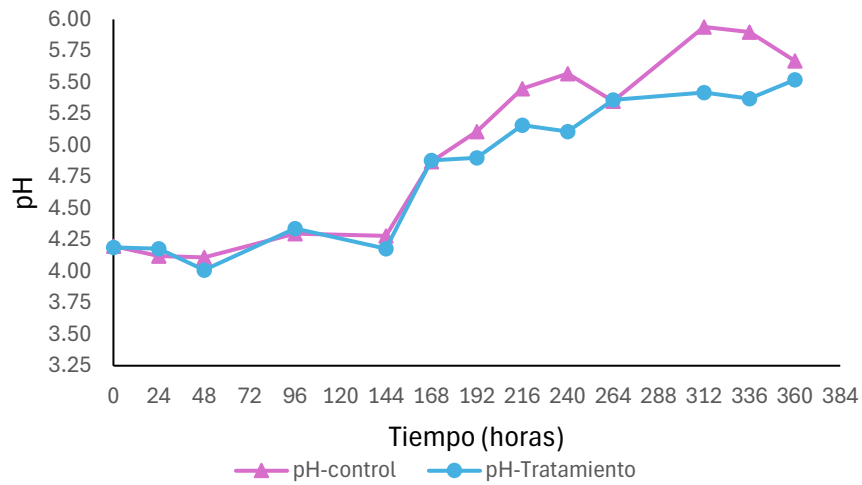
5.4 Fermentación experimental de cacao con cultivo iniciador basado en levaduras silvestres

Un coctel iniciador basado en la mezcla de los cultivos 1d y 18 d, denominado “Tratamiento” fue evaluado en comparación con una fermentación espontánea, denominada “Control”. Durante la fermentación y secado se recolectaron muestras de semillas cada 24 horas para evaluar el pH del interior de la semilla.

La variación del pH a lo largo de la fermentación de granos de cacao, en lotes de 60 kg, se muestra en la Figura 9. Los resultados muestran una tendencia similar a resultados publicados en relación con la adición de cultivos iniciadores, que muestran una disminución en el pH de una forma acelerada en los tratamientos mediante la adición de cultivos iniciadores a lo largo de las primeras 48-72 horas, lo cual deriva de la actividad de acetobacterias facilitada por una producción acelerada de etanol Según Delgado-Ospina et al. (2022). Durante periodos posteriores (>72 h) se observan incrementos en el pH que tal y como se ha descrito en la literatura especializada, responden a factores tales como la conversión del ácido cítrico en ácido láctico y acético, así como debido a subsiguiente oxidación del ácido acético y láctico, y el incremento en compuestos básicos. Según Delgado-Ospina et al. (2022).

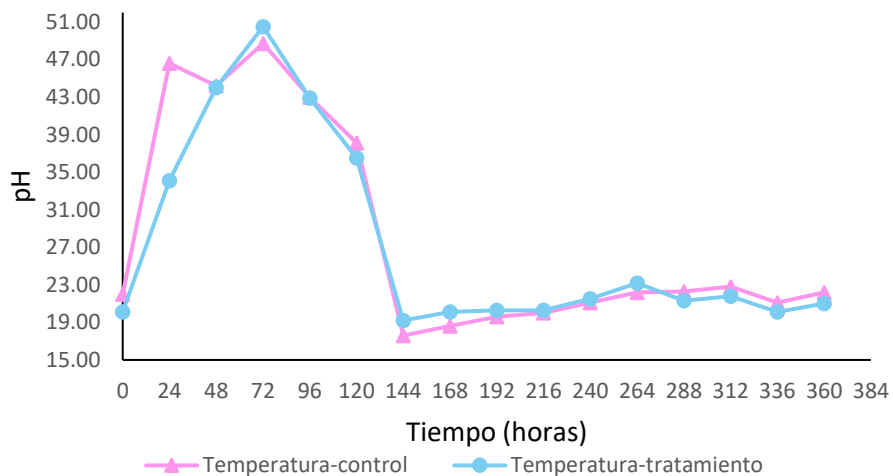
En ambos casos, para el control y el tratamiento, al final de la fermentación se alcanza un pH cercano a 5, lo cual se ubica en el rango óptimo de pH 4.5-5.5, dado que valores menores a 4.5 se asocian con menor difusión de ácidos orgánicos y por tanto menor concentración de compuestos volátiles en las semillas, así como valores mayores a 5.5 evidencian una fermentación deficiente asociada a mayor astringencia y amargor (Horta-Téllez et al., 2019). Cambios en el pH posteriores a las 168 h corresponden con factores asociados al proceso de secado solar.

Figura 8. Variación del pH dentro de la semilla durante el periodo de fermentación y secado del cacao con y sin cultivo iniciador



De forma consistente con lo observado en la evolución del pH, la Figura 10 muestra mayores temperaturas alcanzadas a las 72 h mediante la adición del cultivo iniciador en comparación la fermentación espontanea. Finalmente, se observa a las 144 h una caída drástica en la temperatura, lo cual se debe a la conclusión del proceso fermentativo aeróbico e inicio del secado.

Figura 9. Variación de la temperatura dentro de la semilla durante el periodo de fermentación y secado del cacao con y sin cultivo iniciador



5.5 Análisis del perfil volátil de cacao fermentado y seco mediante GC-MS

Los resultados del análisis GC-MS en semillas de cacao fermentadas y secas revelan variaciones en los niveles de compuestos volátiles entre las muestras del control y las del tratamiento. Los resultados en la Tabla 3 muestran compuestos dominantes en el perfil volátil de granos de cacao fermentadas y secas, con o sin la adición del cultivo iniciador.

Si bien todos los compuestos predominantes, en particular ésteres del ácido acético, se asocian con diversos descriptores frutales y florales, los resultados evidencian perfiles diferenciados. Destacan en las muestras de cacao fermentadas con el cultivo iniciador mayores contenidos de alcohol fenílico, asociado a notas florales, rosas, y miel, distintivo de cacaos finos.

Tabla 3. Compuestos volátiles predominantes en muestras de cacao fermentadas y secada mediante el uso de cultivo iniciador versus fermentación espontánea (control).

ID Muestra	Compuesto y Tiempo de Retención (s)					
	1-Propanol -2-metilo, 18.3	Acetato de etilo, 26.4	Acetato de isobutilo 33.1	acetato de 2-pentanol 42.1	Fenilacetaldéhid 58.2	Alcohol fenílico 64.2
Control A	0.8	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
Control B	0.5	0.4	0.2	0.0	0.5	0.0
Control C	1.0	0.5	1.0	0.0	1.0	0.0
Tratamiento A	0.0	1.0	0.6	1.0	0.4	0.6
Tratamiento B	0.0	0.1	0.2	0.5	0.5	1.0
Tratamiento C	0.0	0.1	0.4	0.4	0.4	1.0

Los perfiles volátiles diferenciados generados mediante 1) técnicas de fermentación espontánea versus 2) técnicas de fermentación controlada, utilizándose un cultivo iniciador enriquecido en levaduras silvestres, se evidencian en los cromatogramas en Figuras 9-10, respectivamente. Destacan en ambos gráficos, en tiempo de retención 26.4 s, un alto contenido de acetato de etilo, un compuesto volátil asociado a notas frutales. A su vez se observa en cromatogramas para muestras del tratamiento con levaduras silvestres, mayores

contenidos de volátiles después de 60 s tales como el alcohol fenético, asociado a notas de rosas y miel, un descriptor altamente deseable en cacaos finos.

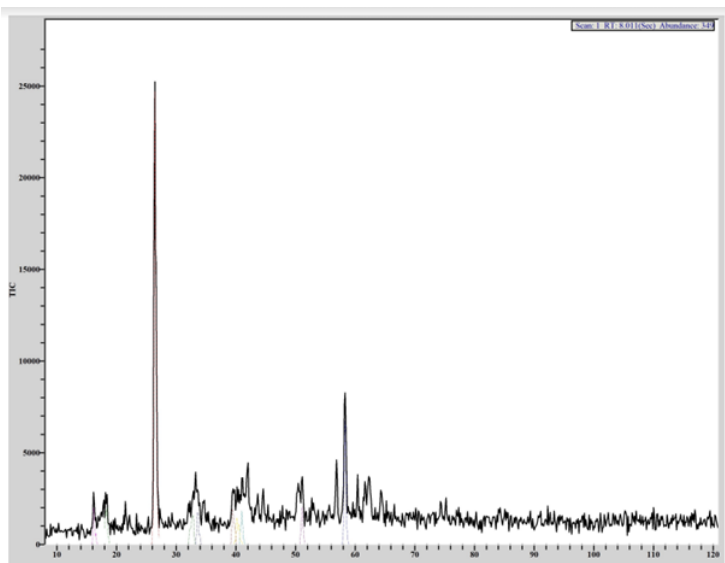


Figura 10. Perfil volátil mediante SPME-GCMS de muestras de cacao seco, fermentado espontáneamente (control B).

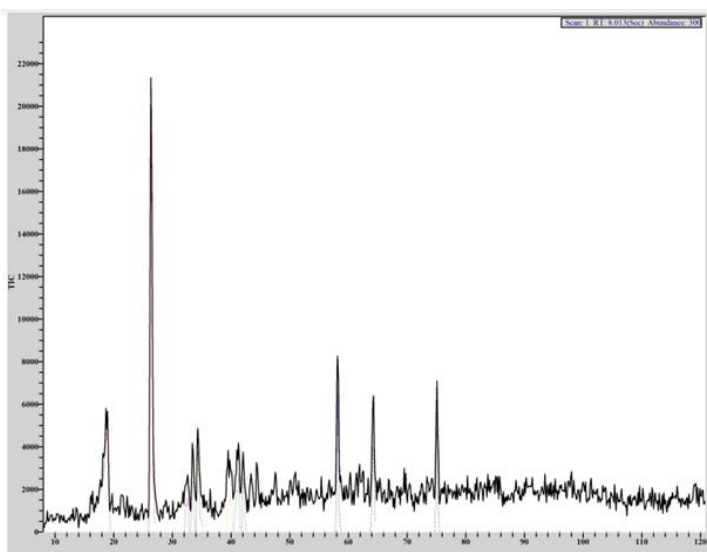


Figura 11. Perfil volátil mediante SPME-GCMS de muestras de cacao seco, fermentado espontáneamente (tratamiento B).

5.6 Análisis en NIR

Los resultados de análisis mediante NIR en la Tabla 4, generados a partir de modelos de predicción previamente desarrollados, confirman perfiles de calidad diferenciados de muestras de cacao fermentadas y secas, para el control versus el tratamiento con un cultivo iniciador basado en levaduras silvestres. Se observan valores superiores de acidez titulable en el tratamiento (8.88 vs 6.42), producto de una fermentación acelerada que resultó en menores valores de pH, tal y como se ilustra en la Figura 9.

Los valores de humedad, grasa, proteína y cenizas no varían significativamente, puesto que estos responden a variables genéticas y del proceso de secado. Por su parte, los parámetros de color muestran diferencias notables; los tratamientos tienden a tener valores más bajos en Color_a (11.87 frente a 12.32 en los controles) y Color_b (12.30 frente a 13.80 en los controles), pero valores más altos en Color_L (29.41 frente a 27.60 en los controles). Lo cual indica que los tratamientos podrían alterar la percepción visual del producto.

De manera similar, se observan valores superiores en la relación de cafeína y teobromina para muestras del tratamiento (4.98 frente a 2.10), lo que puede influir en el sabor y los efectos estimulantes del producto. Además, la epicatequina, que tiene propiedades antioxidantes, es más alta en los tratamientos (4.87 mg/g) en comparación con los controles (3.28 mg/g), lo que podría añadir beneficios para la salud.

Los tratamientos aumentan significativamente la acidez, la cafeína/teobromina y la epicatequina, mientras que mantienen la humedad, grasa, proteína y cenizas en niveles comparables a los controles. Las diferencias en los parámetros de color pueden influir en la apariencia del producto, lo cual es un aspecto importante para considerar en su presentación y aceptación por parte del consumidor. Este análisis puede guiar decisiones sobre qué tratamientos aplicar para obtener los resultados deseados en términos de sabor, beneficios para la salud y apariencia visual del producto.

Tabla 4. Resultados promedio mediciones NIR cacao seco.

Criterio	Tratamiento	Control
Acidez Total	8.88	6.42
Humedad	8.65	8.31
Grasa	52.51	51.82
Proteína	13.52	13.33
Cenizas	2.98	2.76
Cafeína Teobromina	4.98	2.10
Epicatequina	4.87	3.28
Color_a	11.87	12.32
Color_b	12.30	13.80
Color_L	29.41	27.60

6. Conclusiones

Este estudio ha demostrado el potencial de levaduras silvestres presentes en ecosistemas inmediatos a sistemas de fermentación y manejo poscosecha del cacao, hacia el desarrollo de técnicas de fermentación controlada que contribuyan con estrategias de diferenciación de la calidad. Se evaluaron levaduras silvestres presentes en frutos tropicales del entorno inmediato al sistema de fermentación de cacao, se identificaron diversos cultivos microbiológicos según su potencial en la producción de compuestos volátiles diferenciadores del perfil aromático.

Mediante técnicas de análisis SPME-GCMS de cultivos microbiológicos fue posible realizar procesos de selección y optimización de sistemas de fermentación controlada. En este estudio se evaluó un coctel microbiológico compuesto por dos levaduras silvestres, previamente valoradas por su capacidad en la producción de compuestos volátiles. Se demostró la capacidad de dicho cultivo iniciador en el desarrollo de perfiles diferenciadores de calidad, mediante la aceleración de la actividad microbiológica en las primeras 48 h de la fermentación, lo que derivó en mayores contenidos de compuestos tales como el alcohol fenílico, un descriptor asociado a notas florales en cacaos finos.

La combinación de técnicas de análisis como SPME-GCMS así como el uso del NIR, facilitó un proceso de innovación acelerada que podría ser implementado en el desarrollo de sistemas de fermentación controlada conducentes a productos altamente diferenciadores.

7. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- Avalos, Á., Rocio, J., Santos, R., Nathaly, B., Monge, S., & Maricela, G. (2016) “*Plan de exportación de cacao orgánico hacia el mercado de la Unión europea. Caso ilustrativo Caritas El Salvador*”.
- Barrientos, L. D. P., Oquendo, J. D. T., Garzón, M. A. G., & Álvarez, O. L. M. (2019) Effect of the solar drying process on the sensory and chemical quality of cocoa (theobroma cacao l.) cultivated in Antioquia, Colombia. *Food Research International*, 115, 259–267. <https://doi.org/10.1016/J.FOODRES.2018.08.084>
- Batista, N. N., Ramos, C. L., Ribeiro, D. D., Pinheiro, A. C. M., & Schwan, R. F. (2015) Dynamic behavior of *saccharomyces cerevisiae*, *pichia kluyveri* and *hanseniaspora uvarum* during spontaneous and inoculated cocoa fermentations and their effect on sensory characteristics of chocolate. *Iwt*, 63(1), 221–227. <https://doi.org/10.1016/j.jwt.2015.03.051>
- Beg, M. S., Ahmad, S., Jan, K., & Bashir, K. (2017) Status, supply chain and processing of cocoa - a review. *Trends in Food Science & Technology*, 66, 108–116. <https://doi.org/10.1016/J.TIFS.2017.06.007>
- Bickel Haase, T., Naumann-Gola, S., Ortner, E., Zorn, H., & Schweiggert-Weisz, U. (2023). Thermal stabilisation of cocoa fruit pulp — Effects on sensory properties, colour and microbiological stability. *Current Research in Food Science*, 7. <https://doi.org/10.1016/j.crfs.2023.100549>
- Boza, E. J., Motamayor, J. C., Amores, F. M., Cedeñ O-Amador, S., Tondo, C. L., Livingstone, D. S., Schnell, R. J., & Gutiérrez, O. A. (2014) Genetic characterization of the cacao cultivar CCN 51: Its Impact and Significance on Global Cacao Improvement and Production. In *J. Amer. soc. hort. sci* (Vol. 139, Issue 2).
- Brade Monge - SEPSA, I. (2017). Análisis de la actividad cacaotera costarricense y perspectivas de su reactivación secretaría ejecutiva de planificación sectorial agropecuaria. www.sepsa.go.cr
- Contreras, C., Ortiz de Bertorelli, L., Graziani de Fariñas, L., & Parra, P. (2004) Fermentadores para cacao usados por los productores de la localidad de Cumboto, Venezuela. *Agronomía Tropical*, 54(2), 219–232. http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0002-192X2004000200006&lng=es&nrm=iso&tlng=es
- Cuvelier, M.-E., & Maillard, M.-N. (2012). *Oilseeds and fats crops and lipids*. 19(2), 125–132 <https://doi.org/10.1051/ocl.2012.0440i>

- Delgado-Ospina, J., Acquaticci, L., Molina-Hernandez, J. B., Rantsiou, K., Martuscelli, M., Kamgang-Nzekoue, A. F., Vittori, S., Paparella, A., & Chaves-López, C. (2022). Exploring the capability of yeasts isolated from Colombian fermented cocoa beans to form and degrade biogenic amines in a lab-scale model system for cocoa fermentation. *Fermentation*, 8(1), 29. <https://doi.org/10.3390/fermentation8010029>
- De Vuyst, L., & Leroy, F. (2020) Functional role of yeasts, lactic acid bacteria and acetic acid bacteria in cocoa fermentation processes. In *FEMS Microbiology Reviews* (Vol. 44, Issue 4, pp. 432–453). Oxford University Press. <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. In *Journal of Applied Microbiology* (Vol. 121, Issue 1, pp. 5–17). Blackwell Publishing Ltd. <https://doi.org/10.1111/jam.13045>
- Díaz-Muñoz, C., Van de Voorde, D., Comasio, A., Verce, M., Hernandez, C. E., Weckx, S., & De Vuyst, L. (2021) Curing of cocoa beans: fine-scale monitoring of the starter cultures applied and metabolomics of the fermentation and drying steps. *Frontiers in Microbiology*, 11. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.616875>
- Díaz-Valderrama, J. R., Leiva-Espinoza, S. T., & Catherine Aime, M. (2020) The history of cacao and its diseases in the americas. *Phytopathology*, 110(10), 1604–1619. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-05-20-0178-RVW>
- Dzelagha, B. F., Ngwa, N. M., & Bup, D. N. (2020) A review of cocoa drying technologies and the effect on bean quality parameters. In *International Journal of Food Science* (Vol. 2020). Hindawi Limited. <https://doi.org/10.1155/2020/8830127>
- 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. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.130627>
- Fernández-Niño, M., Rodríguez-Cubillos, M. J., Herrera-Rocha, F., Anzola, J. M., Cepeda-Hernández, M. L., Aguirre Mejía, J. L., Chica, M. J., Olarte, H. H., Rodríguez-López, C., Calderón, D., Ramírez-Rojas, A., Del Portillo, P., Restrepo, S., & González Barrios, A. F. (2021). Dissecting industrial fermentations of fine flavour cocoa through metagenomic analysis. *Scientific Reports*, 11(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-021-88048-3>
- Gabaldón, T. (2020). Hybridization and the origin of new yeast lineages. In *Fems Yeast Research* (Vol. 20, Issue 5). Oxford University Press. <https://doi.org/10.1093/femsyr/foaa040>
- García Gonzalez, E., Mendez Orejuela, J. H., Sierra Banguera, J. S., Chamorro Moreno, D. I., Ordoñez Narváez, G. A., Ochoa Muñoz, A. F., & Montalvo Rodriguez, C. (2022).

Ecology and population dynamics of yeast starter cultures in cocoa beans fermentation. *Biotechnologia*, 103(4), 343–353.
<https://doi.org/10.5114/bta.2022.120704>

- Gopaulchan, D., Motilal, L. A., Bekele, F. L., Clause, S., Ariko, J. O., Ejang, H. P., & Umaharan, P. (2019) Morphological and genetic diversity of cacao (*theobroma cacao* L.) in uganda. *physiology and molecular biology of plants*, 25(2), 361–375.
<https://doi.org/10.1007/s12298-018-0632-2>
- Gorter De Vries, A. R., Pronk, J. T., & Daran, J. M. G. (2019). Lager-brewing yeasts in the era of modern genetics. *FEMS Yeast Research*, 19(7).
<https://doi.org/10.1093/femsyr/foz063>
- Greenberg, J. A., O'donnell, R., Shurpin, M., & Kordunova, D. (2016). Epicatechin, procyanidins, cocoa, and appetite: a randomized controlled trial. *American Journal of Clinical Nutrition*, 104(3), 613–619. <https://doi.org/10.3945/ajcn.115.129783>
- Henderson, J. S., Joyce, R. A., Hall, G. R., Hurst, W. J., & Mcgovern, P. E. (2007) *Chemical and archaeological evidence for the earliest cacao beverages*.
www.pnas.org/cgi/content/full/
- Hernández-Hernández, C., Viera-Alcaide, I., Morales-Sillero, A. M., Fernández-Bolaños, J., & Rodríguez-Gutiérrez, G. (2018). Bioactive compounds in mexican genotypes of cocoa cotyledon and husk. *Food Chemistry*, 240, 831–839.
<https://doi.org/10.1016/J.FOODCHEM.2017.08.018>
- Horta-Téllez, H. B., Sandoval-Aldana, A. P., Garcia-Muñoz, M. C., & Cerón-Salazar, I. X. (2019). Evaluation of the fermentation process and final quality of five cacao clones from the department of Huila, Colombia. *DYNA*, 86(210), 233-239.
<https://doi.org/10.15446/dyna.v86n210.75814>
- 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., Hinneh, 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>
- Maicas, S. (2020). The role of yeasts in fermentation processes. in *microorganisms* (Vol. 8, Issue 8, pp. 1–8). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8081142>

- Mendoza Salazar, M. M., Martínez Álvarez, O. L., Ardila Castañeda, M. P., & Lizarazo Medina, P. X. (2022). Bioprospecting of indigenous yeasts involved in cocoa fermentation using sensory and chemical strategies for selecting a starter inoculum. *Food Microbiology*, *101*, 103896. <https://doi.org/10.1016/J.FM.2021.103896>
- 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>
- Navia, A. y, & Pazmiño, V. (2012). *ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DEL LITORAL*.
- Navia, A. y, & Pazmiño, V. (2012). *Mejoramiento de las características sensoriales del cacao ccn51a través de la adición de enzimas durante el proceso de fermentación*.
- Nazaruddin, R., Seng, L. K., Hassan, O., & Said, M. (2006) Effect of pulp preconditioning on the content of polyphenols in cocoa beans (*Theobroma cacao*) during fermentation. *Industrial Crops and Products*, *24*(1), 87–94. <https://doi.org/10.1016/J.INDCROP.2006.03.013>
- Parapouli, M., Sfakianaki, A., Monokrousos, N., Perisynakis, A., & Hatziloukas, E. (2019). Comparative transcriptional analysis of flavour-biosynthetic genes of a native *saccharomyces cerevisiae* strain fermenting in its natural must environment, vs. a commercial strain and correlation of the genes' activities with the produced flavour compounds. *Journal of Biological Research-Thessaloniki*, *26*(1). <https://doi.org/10.1186/s40709-019-0096-8>
- Peña-Correa, R. F., Ataç Mogol, B., & Fogliano, V. (2022) The impact of roasting on cocoa quality parameters. in *critical reviews in food science and nutrition*. Taylor and Francis Ltd. <https://doi.org/10.1080/10408398.2022.2141191>
- Quesada-Arguedas, P., Hernández-Aguirre, C., Vargas-Martínez, A., & Mencía-Guevara, A. (en preparación). *Profiling quality of cocoa using portable Near-Infrared Spectroscopy (NIR), geographical differentiation challenges*.
- Rottiers, H., Tzompa Sosa, D. A., De Winne, A., Ruales, J., De Clippeleer, J., De Leersnyder, I., De Wever, J., Everaert, H., Messens, K., & Dewettinck, K. (2019). Dynamics of volatile compounds and flavor precursors during spontaneous fermentation of fine flavor trinitario cocoa beans. *European Food Research and Technology*, *245*(9), 1917–1937. <https://doi.org/10.1007/s00217-019-03307-y>
- Rivera Fernández, Rubén, D., Wilberto, F., Gallo, M., Monserrate, Á., Cedeño, G., Mercedes, M., Galeas, P., Nolti, H., Quinteros, M., Margarita, L., Ferrín, C., Barrera Álvarez, A. E., & Morante, P. E. N. (2012) Efecto del tipo y tiempo de fermentación en la calidad física y química del cacao (*Theobroma cacao* l.) tipo nacional effect of time

and type of fermentation in physical and chemical quality of cocoa (Theobroma cacao L.) national type

- Sacchetti, G., Ioannone, F., De Gregorio, M., Di Mattia, C., Serafini, M., & Mastrocola, D. (2016) non-enzymatic browning during cocoa roasting as affected by processing time and temperature. *Journal of Food Engineering*, 169, 44–52. <https://doi.org/10.1016/J.JFOODENG.2015.08.018>
- Saltini, R., Akkerman, R., & Frosch, S. (2013) Optimizing chocolate production through traceability: a review of the influence of farming practices on cocoa bean quality. *Food Control*, 29(1), 167–187. <https://doi.org/10.1016/J.FOODCONT.2012.05.054>
- Sandoval-Lozano, C. J., Caballero-Torres, D., & López-Giraldo, L. J. (2022). Screening wild yeast isolated from cocoa bean fermentation using volatile compounds profile. *Molecules*, 27(3). <https://doi.org/10.3390/molecules27030902>
- 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. in *critical reviews in food science and nutrition* (Vol. 60, Issue 10, pp. 1593–1613). Taylor and Francis Inc. <https://doi.org/10.1080/10408398.2019.1581726>
- Santos, D. S., Rezende, R. P., Santos, T. F. dos, Marques, E. de L. S., Ferreira, A. C. R., Silva, A. B. de C. e., Romano, C. C., Santos, D. W. da C., Dias, J. C. T., & Tavares Bisneto, J. D. (2020). Fermentation in fine cocoa type scavina: change in standard quality as the effect of use of starters yeast in fermentation. *Food Chemistry*, 328, 127110. <https://doi.org/10.1016/J.FOODCHEM.2020.127110>
- Seijas, M. G. (2012). *Nota técnica revista científica udo agrícola 12 (4): 914-918. 2012 914.*
- Rojas Rojas Vanessa Tutor Carlos Eduardo Hernández Aguirre, K., Alejandra Mencía Guevara, A., & Vargas Martínez, A. (n.d.). *Universidad Nacional Facultad de Ciencias de la Tierra y el Mar Escuela de Ciencias Agrarias.*
- Voora, V., Bermúdez, S., & Larrea, C. (n.d.). *International Institute for Sustainable Development (IISD) Global Market Report: Cocoa.*
- Whitkus, R., De La Cruz, M., Mota-Bravo, L., & Gómez-Pompa, A. (1998) Genetic Diversity and Relationships of Cacao (*Theobroma cacao L.*) in southern Mexico. *Theoretical and Applied Genetics*, 96(5), 621–627. <https://doi.org/10.1007/s001220050780>