



**UNIVERSIDAD
DEL AZUAY**

FACULTAD DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA

Escuela de Ingeniería de Alimentos

“Fermentación del Cacao de la variedad CCN-51 con reemplazo de pulpa
empleando un cultivo iniciador”

Trabajo de graduación previo a la obtención del título de:
INGENIERO EN ALIMENTOS

Autor:

Jorge Esteban Flor Pérez

Director:

Dr. Rodrigo Sebastián Caroca Cáceres

CUENCA – ECUADOR

2024

DEDICATORIA

Quiero dedicar este trabajo a mis padres quienes me han dado todos los recursos necesarios para lograr culminar mis estudios con éxito, además de brindarme su apoyo y amor incondicional en todo momento.

También quiero dedicar este trabajo a todas las personas que me han ayudado a lo largo de mi vida universitaria, dándome de su compañía y enseñándome cada día cosas nuevas, valores y valiosas lecciones.

AGRADECIMIENTOS

Primero quiero agradecer a Dios por estar conmigo y guiarme en los momentos más difíciles de mi vida, por darme salud y fuerza, bendiciendo a todos mis seres queridos.

Agradezco a todos los buenos docentes que me enseñaron a lo largo de todo este camino, no solo lo relacionado a la carrera, si no a ser una mejor persona y un buen profesional.

De igual manera agradezco a mi tutor de tesis, el Dr. Rodrigo Sebastián Caroca Cáceres por confiar en mí y permitirme realizar mi trabajo de titulación en su área de especialidad, brindándome conocimientos y críticas que me ayudarán en mi vida profesional. También agradezco a todos los laboratoristas que me enseñaron y ayudaron durante este ultimo ciclo universitario, a lograr finalizar este proyecto del cual aprendí muchos más de lo que esperaba. Gracias por su paciencia y hospitalidad.

Por último, pero no menos importante, quiero agradecerme a mí por creer en mí, por siempre tratar de dar más de lo que recibo, por nunca rendirme, por trabajar duro, por tener la disciplina que tengo y por ser la persona que soy a pesar de los duros momentos que he pasado durante mi vida.

FERMENTACIÓN DEL CACAO DE LA VARIEDAD CCN-51 CON REEMPLAZO DE PULPA EMPLEANDO UN CULTIVO INICIADOR

RESUMEN

El presente trabajo constituye un informe técnico sobre fermentación del cacao de la variedad ccn-51 con reemplazo de pulpa empleando un cultivo iniciador. La calidad de fermentación del cacao está determinada por varios factores. Uno de ellos es la biodiversidad de los microorganismos que pueden estar presente a lo largo de la fermentación como levaduras, BAL y BAA. El objetivo general de este trabajo fue analizar la calidad de fermentación de cacao CCN-51 con reemplazo de pulpa empleando este cultivo iniciador, analizando la dinámica de crecimiento de los microorganismos a lo largo de la fermentación e identificándolos mediante pruebas de PCR. Se desarrollaron dos fermentaciones, una de manera espontánea (FE) y otra con un cultivo iniciador (CI) compuesto por las levaduras *S. cerevisiae*, *P. kudriavzevii*, y las bacterias *L. plantarum* y *A. ghanensis*. Mediante un conteo de colonias se constató que el número de levaduras fue mayor a lo largo de la fermentación seguido de BAL y BAA. Las pruebas de PCR mostraron que *S. cerevisiae* predominó todos los días de fermentación, mientras que *L. plantarum* solo un día y *A. ghanensis* ninguno. Se evidenció una mejor fermentación de los granos de cacao en CI con un 24% de granos bien fermentados frente a un 2% en FE.

Palabras clave: Cacao CCN-51, cultivo iniciador, ADN, microorganismos, fermentación.

FERMENTATION OF COCOA OF THE CCN-51 VARIETY WITH PULP REPLACEMENT USING A STARTER CULTURE

ABSTRACT

This work constitutes a technical report on fermentation of cocoa of the ccn-51 variety with pulp replacement using a starter culture. The fermentation quality of cocoa is determined by several factors. One of them is the biodiversity of the microorganisms that may be present throughout the fermentation such as yeasts, LAB and BAA. The general objective of this work was to analyze the fermentation quality of CCN-51 cocoa with pulp replacement using this starter culture, analyzing the growth dynamics of the microorganisms throughout the fermentation and identifying them through PCR tests. Two fermentations were developed, one spontaneously (FE) and the other with a starter culture (IC) composed of the yeasts *S. cerevisiae*, *P. kudriavzevii*, and the bacteria *L. plantarum* and *A. ghanensis*. Through a colony count it was confirmed that the number of yeasts was greater throughout the fermentation followed by BAL and BAA. PCR tests showed that *S. cerevisiae* predominated on all days of fermentation, while *L. plantarum* only one day and *A. ghanensis* none. A better fermentation was observed for cocoa beans fermented with CI, accounting 24% of well fermented beans, compared to 2% obtained with FE.

Keywords: Cacao CCN-51, starter culture, DNA, microorganisms, fermentation.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

| | |
|--|-----|
| RESUMEN | iii |
| ABSTRACT..... | iv |
| ÍNDICE DE CONTENIDOS | v |
| INTRODUCCIÓN | 1 |
| CAPÍTULO I – METODOLOGÍA | 5 |
| 1.1. Generación de biomasa de microorganismos para el cultivo iniciador | 5 |
| 1.2. Fermentación del cacao con reemplazo de pulpa y con cultivo iniciador | 6 |
| 1.3. Optimización de medios de cultivo selectivos para la siembra de microorganismos durante la fermentación del cacao | 7 |
| 1.4. Registro de temperatura y pH..... | 8 |
| 1.5. Pruebas moleculares para identificación de microorganismos..... | 8 |
| 1.6. Prueba de corte | 9 |
| CAPÍTULO II – RESULTADOS Y DISCUSIÓN | 9 |
| 2.1. Análisis de temperatura y pH | 9 |
| 2.2 Dinámica de crecimiento de microorganismos | 12 |
| 2.3. PCR y tinciones | 13 |
| 2.4. Prueba de corte | 24 |
| CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES | 26 |
| REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICA | 28 |
| ANEXOS | 35 |

ÍNDICE DE TABLAS

| | |
|---|----|
| Tabla 1 | 7 |
| <i>Diluciones sembradas cada día de fermentación en su respectivo medio de cultivo en la fermentación espontánea (FE) y en la del cultivo iniciador (CI).</i> | 7 |
| Tabla 2 | 14 |
| <i>Tinciones de colonias presentes en medio GYC del CI</i> | 14 |
| Tabla 3 | 17 |
| <i>Tinciones de colonias presentes en medio MRS del CI</i> | 17 |
| Tabla 4 | 20 |
| <i>Tinciones de colonias presentes en medio PDA del CI</i> | 20 |
| Tabla 5 | 23 |
| <i>Tinciones de colonias presentes en medio PDA de FE</i> | 23 |

ÍNDICE DE FIGURAS

| | |
|---|-----------|
| <i>Figura 1. Análisis del pH y temperatura de la fermentación espontánea (FE) y del cultivo iniciador (CI) y de los granos de cacao.....</i> | <i>10</i> |
| <i>Figura 2. Dinámica de crecimiento de presuntas levaduras, BAA y BAL (FE – Fermentación espontánea; CI – Cultivo iniciador)</i> | <i>12</i> |
| <i>Figura 3. Electroforesis de PCR de colonias presentes en medio GYC del CI.</i> | <i>15</i> |
| <i>Figura 4. Electroforesis de PCR de colonias presentes en medio MRS del CI.</i> | <i>19</i> |
| <i>Figura 5. Electroforesis de PCR de colonias presentes en medio PDA del CI.</i> | <i>22</i> |
| <i>Figura 6. Electroforesis de PCR de colonias presentes en medio PDA de FE.</i> | <i>24</i> |
| <i>Figura 7. Prueba de corte de granos de cacao CCN -51 proveniente de la fermentación espontánea (A) y fermentación con cultivo iniciador (B).....</i> | <i>25</i> |

ÍNDICE DE ANEXOS

| | |
|--|----|
| Anexo 1 – Medios formulados para la generación de Biomasa..... | 35 |
| Anexo 2 – Tinciones del medio GYC de CI..... | 36 |
| Anexo 3 – Tinciones de medio MRS del CI..... | 37 |
| Anexo 4 – Geles de electroforesis de colonias presentes en medio MRS | 38 |
| Anexo 5 – Tinciones del medio PDA de CI | 40 |
| Anexo 6 – Tinciones del medio PDA de FE..... | 41 |

FERMENTACIÓN DEL CACAO DE LA VARIEDAD CCN-51 CON REEMPLAZO DE PULPA EMPLEANDO UN CULTIVO INICIADOR

INTRODUCCIÓN

Fermentación del cacao y microorganismos que participan en el proceso

La fermentación del cacao, la cual puede durar hasta siete días, es clave para lograr el desarrollo de compuestos fenólicos, alcaloides, polifenoles y ácidos volátiles. Estas moléculas son responsables de la pigmentación color marrón y sirven como precursores de aromas y sabores, los cuales determinarán la calidad física y química de la fermentación (Rivera et al., 2012; Teneda, 2016; Chávez-Salazar., 2023). Que estos compuestos se desarrollen de una manera eficaz dependerá de varios factores, entre ellos: el tipo de grano de cacao, origen geográfico, época de cosecha, condiciones ambientales, prácticas de manejo, tipo de material que se utiliza para la fermentación (cajas de madera, sacos de yute, tinas de plástico, entre otros), el método de drenado del exudado producido por la masa de cacao, procesos tecnológicos, la contaminación ambiental (aire, polvo o microorganismos) y la acción de enzimas endógenas (De Vuyst & Weckx., 2016; Magagna et al., 2017; Tovar et al., 2020).

El proceso de fermentación del cacao se puede dar espontánea o naturalmente y ocurre en la pulpa, es decir, en el mucílago que recubre los granos (Wacher, 2011). Este mucílago contiene todos los nutrientes necesarios para la proliferación de grupos particulares de microorganismos los cuales a su vez generan metabolitos que ayudan a cambiar las características de los granos de cacao. Dentro de la composición del mucílago se encuentran carbohidratos como glucosa, fructosa y sacarosa con un 10-13%, además de 1-2% ácido cítrico, un 82-87% de agua y 8-10% de sales (Tovar et al., 2020).

La fermentación del cacao se da en diferentes etapas, cada una de ellas representando la proliferación de un grupo de microorganismos distinto. La diversidad microbiana durante la fermentación se ha logrado identificar, empleando métodos que incluyen análisis metagenómicos, métodos de cultivo, secuenciación de regiones génicas conservadas como el ARNr 16S o la utilización de primers específicos como (GTG)₅. Estas herramientas han permitido la clasificación e identificación de levaduras, bacterias ácido lácticas (BAL), bacterias ácido acéticas (BAA), y algunas especies del género *Bacillus*, estas últimas son

sinónimo de una mala fermentación (De Vuyst et al., 2008; Wacher., 2011; Teneda., 2016; Visintin., 2016; Serra et al., 2019; Agyirifo et al., 2019; Mota-Gutiérrez et al., 2018).

Durante la primera etapa, los microorganismos dominantes son las levaduras, debido a los carbohidratos presentes en el mucílago como la glucosa, fructosa y sacarosa, además de un pH bajo de 3.3 debido al ácido cítrico. Las levaduras consumen estos azúcares produciendo metabolitos secundarios como el etanol y son responsables de la disminución del ácido cítrico y el oxígeno. Adicionalmente, ayudarán a la eliminación del mucílago de los granos de cacao mediante la despolimerización de pectina. Dentro de las diferentes especies de levaduras que se han logrado identificar se encuentran *Hanseniaspora guilliermondii*, *H. opuntiae*, *Candida pelliculosa*, *C. silvae*, *C. zemplinina*, *C. diversa*, *C. krusei*, *C. halmiae*, *C. tropicalis*, *C. zeylanoide*, *Geotrichum ghanense*, *C. awuaitii*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia membranaefaciens*, *P. kudriavzevii*, *Kluyveromyces marxianus*, *Torulopsis candida*, *T. castelli*, *T. holmii*, *Kloeckera apiculata*, *K. apis* (Jespersen et al., 2005; Daniel et al., 2009; Wacher., 2011; Kouame et al., 2015; Meersman et al., 2016; Koné et al., 2016; Ordoñez-Araque RH., 2020; Rodríguez-Velázquez et al., 2022).

En la segunda etapa, las BAL continúan metabolizando los carbohidratos residuales del mucílago, logrando crear un medio con menos cantidad de alcohol, produciendo ácido láctico y reduciendo la fructosa a manitol. Las especies que se han logrado identificar son *Lactiplantibacillus plantarum*, *L. fermentum*, *L. collonides*, *L. mesenteroides*, *L. mali*, *L. cellobiosus*, *Fructobacillus pseudoficulneus*, *Lactococcus lactis*, *Leuconostoc fallax*, *L. pseudomesenteroides*, *L. pseudoficulneum*, *L. mesenteroides*, *Weisella cibaria*, *W. fabaria*, *Enterococcus casseliflavus*, *E. saccharolyticus* y *Pediococcus acidilactici*, entre otras (Wacher, 2011; Moreira et al., 2017; Ouattara et al., 2017 Ordoñez-Araque RH., 2020; Rodríguez-Velázquez et al., 2022).

En una tercera etapa proliferan las BAA, las cuales metabolizan el alcohol producido por las levaduras, oxidándolo a acetaldehído y después a ácido acético (Teneda., 2016). Estas reacciones producen un aumento de temperatura en la masa de fermentación de hasta 50 °C dependiendo de la masa total que se esté fermentando, logrando así aumentar la acidez en lo granos y causar la muerte del embrión. Las especies de BAA más comúnmente encontradas en la fermentación de cacao son *Gluconobacter oxydans*, *G. xilenos*, *Acetobacter aceti*, *A. pasteurianus*, *A. syzygii*, *A. tropicalis*, *A. fabarum*, *A. senegalensis*, *Roseomonas sp*,

Acidisphaera sp, *Komagataeibacter hansenii*. (Wacher., 2011; Moreira et al., 2017; Ordoñez-Araque RH., 2020; Rodríguez-Velázquez et al., 2022)

Se puede dar una cuarta etapa, debido a las altas temperaturas que se puede alcanzar durante la tercera etapa, la aireación de la masa y el aumento de pH. En esta etapa proliferan bacterias aerobias formadoras de esporas, las cuales pueden producir compuestos químicos que contribuyen con sabores desagradables del chocolate, como ácidos grasos libres, ácido acético y láctico, 2-3 butanodiol y la tetrametilpirazina. (Dulce et al., 2021). Estas bacterias pertenecen en su mayoría al género *Bacillus* como *B. licheniformis*, *B. megaterium*, *B. pumilus* *B. subtilis*, *B. megaterium* y *B. pumilus*, *B. stearothermophilus*, *B. coagulans*, *B. circulans*, *B. cereus* (Wacher., 2011; Moreira et al., 2017; Rodríguez-Velázquez et al., 2022). Pasados los 6 días de fermentación, se han encontrado tipos de bacterias diferentes a las ya mencionadas, como *Micrococcus luteus*, *M. flavus*, *Xanthomonas citri*, *Arthrobacter insolita*, *Brevibacterium amoniagenes*, *Corynebacterium xerosis*, *Zymomonas mobilis*, *Staphylococcus capitis*, *S. aureus*, *S. hominis* y *Micrococcus kristinae*. Probablemente estas pueden venir de la superficie de las mazorcas, manos de los agricultores, procesos de división de las mazorcas, superficies de los recipientes de fermentación y del suelo (Wacher., 2011; Rodríguez-Velázquez et al., 2022).

Cultivos iniciadores aplicados para la fermentación de cacao

Debido a que la fermentación del cacao es un proceso que se da de manera espontánea, un buen resultado depende de varios factores. Quizás el más relevante es la proliferación de microorganismos, los cuales serán responsables de lograr el desarrollo de diferentes compuestos aromáticos y sabores (Moreira et al., 2017). La diversidad microbiana puede variar notablemente dependiendo de las condiciones de fermentación y, en consecuencia, los resultados finales pueden ser poco predecibles. Por estas razones se han intentado desarrollar diferentes cultivos iniciadores con el objetivo de tener una fermentación más controlada y mejorar las características del cacao mediante la síntesis de moléculas precursoras de sabores y aromas (Salazar et al., 2022).

Un cultivo iniciador es una preparación de cultivos microbiológicos, los cuales pueden ser utilizados para mejorar la calidad de los granos de cacao, permitiendo tener un mejor control del proceso de fermentación (Malo & Urquhart, 2016; Díaz-Muñoz et al., 2021). Una de las mayores ventajas de utilizar cultivos iniciadores para la fermentación del cacao, es que permiten mejorar las características organolépticas del producto final como la textura, sabor y

aroma. En la actualidad, a nivel industrial se puede encontrar cultivos iniciadores en estado liofilizado, seco o congelado (Malo & Urquhart, 2016; Martínez & Sánchez., 2017;). Diferentes criterios se toman en cuenta para poder seleccionar un microorganismo como cultivo iniciador, como su crecimiento bajo condiciones ambientales estresantes, la identificación de cepas productoras de metabolitos de interés y la evaluación de parámetros tecnológicos como la caracterización sensorial (Malo & Urquhart, 2016; Pereira et al., 2020; Salazar et al., 2022).

Durante los últimos años se han propuesto varios cultivos iniciadores para la fermentación del cacao, los cuales fueron seleccionados debido a su gran abundancia durante una fermentación espontánea y por su producción de compuestos aromáticos, ácido láctico, ácido acético y etanol (Batista et al., 2016; Figueroa – Hernández et al., 2019; Pereira et al., 2020; Díaz-Muñoz et al., 2021; Gutiérrez-Ríos et al., 2022; Díaz-Muñoz et al., 2023). Los cultivos iniciadores para la fermentación del cacao estarían compuestos por levaduras, bacterias ácido lácticas y acéticas, las cuales ya han sido aisladas y preparadas previamente en medios de cultivos ricos en nutrientes, evitando la presencia de otros tipos de microorganismos patógenos como hongos filamentosos (Visintin et al., 2017).

Las levaduras corresponden al grupo de microorganismos más utilizados debido a que se ha logrado evidenciar que producen diferentes compuestos aromáticos como aldehídos superiores, alcoholes superiores, ácidos orgánicos y ésteres (Díaz-Muñoz et al., 2021). Entre las especies de levaduras que se han utilizado como cultivo iniciador están *S. cerevisiae*, *P. kluyveri*, *P. kudriavzevii*, *Kluyveromyces marxianus*, *K. fragilis*, *Torulaspora delbrueckii*, *Candida famata*, *C. norvegensis*, *C. tropicalis*, *Hanseniaspora guilliermondii*, *H. uvarum* (Díaz-Muñoz & Luc De Vuyst., 2021). En cuanto a bacterias ácido lácticas y acéticas, se han utilizado *L. plantarum*, *L. fermentum*, *L. delbrueckii*, *A. pasteurianus*, *A. tropicalis*, *A. ghanensis*, *A. fabarum*, *A. senegalensis*, *A. aceti* y *Gluconobacter oxydans* (Lefeber et al., 2012; Meersman et al., 2016; L. De Vuyst & S. Weckx., 2016; Moreira et al., 2017). Los estudios que se han realizado para estos microorganismos, con el fin de examinar sus comportamientos y efectos como cultivo iniciador, han sido análisis microbiológicos, pruebas moleculares mediante PCR (Polymerase Chain Reaction) empleando primers inespecíficos como (GTG)₅ para la identificación de bacterias (De Vuyst et al., 2008), aisladas de los granos de cacao fermentado. Adicionalmente, el primer (GTG)₃ y la pareja de primers tTRNASc/ISSR-MB se han empleado en estudios para diferenciar las diversas especies de levaduras presentes en el vino (Nisiotou, 2022). Otras metodologías tales como ASV (Amplicon Variant Sequence) y electroforesis en gel con gradiente de desnaturalización (DGGE), utilizando primers específicos para cada

microorganismo han contribuido a comprender la dinámica de proliferación de los microorganismos durante la fermentación del cacao. Por otro lado, análisis de compuestos volátiles mediante pruebas como cromatografía de gases y análisis sensoriales mediante panelistas especializados, se han empleado para comparar las características organolépticas obtenidas después de la fermentación. Los resultados han sido positivos ya que han mostrado mayor presencia de los microorganismos presentes en el cultivo iniciador durante la fermentación, mayores concentraciones de compuestos volátiles y diferencias significativas en cuanto al aroma (Lefeber et al., 2012; Meersman et al., 2016; Visintin et al., 2017; Moreira et al., 2017; Díaz-Muñoz et al., 2021; Salazar et al., 2022)

CAPÍTULO I – METODOLOGÍA

1.1. Generación de biomasa de microorganismos para el cultivo iniciador

El cultivo iniciador que se preparó para esta fermentación se conformó por bacterias ácido acéticas (BAA), bacterias ácido lácticas (BAL) y levaduras, los cuales fueron previamente aisladas y seleccionadas. Para BAA se utilizó la especie *Acetobacter ghanensis*, como BAL se utilizó *Lactiplantibacillus plantarum*, y para las levaduras se utilizaron dos especies diferentes, *Saccharomyces cerevisiae* y *Pichia kudriavzevii*. La generación de biomasa de estos microorganismos se realizó empleando medios de cultivo enriquecidos con diferentes nutrientes dependiendo de las necesidades de cada bacteria y levadura (Anexo 1). Adicionalmente, se emplearon condiciones de tiempo y temperatura de incubación específicos para cada uno. Luego de evaluar distintas formulaciones de medios, se decidió utilizar medio MRS enriquecido con 10 g/L de peptona para crecer *L. plantarum*. Para las levaduras se utilizó medio YPG, enriquecido con 2% de glucosa, 0.5% de extracto de levadura y 1% de peptona. Por último, para *A. ghanensis* se determinó que la mejor formulación correspondió a medio GYC, extracto de levadura al 1%, glucosa al 5%, Natamicina al 0.01% y etanol al 5%, regulándolo a pH de 5,5 con ácido cítrico.

Una vez estandarizados los caldos, se cultivaron en ellos los microorganismos y se obtuvo un pellet de cada uno, lo que representa a la “biomasa”. Como primer paso, se preparó un precultivo en un Erlenmeyer, donde se adicionaron 20 ml de caldo nutritivo que fue inoculado con una colonia del microorganismo correspondiente. En el caso de las levaduras, se incubó por 17 h para *S. cerevisiae* y 20 h para *P. kudriavzevii*, ambas a una temperatura de 30 °C. En el caso de *L. plantarum* se incubó por 20 h a una temperatura de 37 °C. Para *A. ghanensis*, se incubó por 72 h a una temperatura de 40 °C y en agitación a 120 rpm. Una vez pasado el tiempo

de incubación, se realizó una lectura en el espectrofotómetro (Genesys 50, Thermo Scientific) a 600 nm, con el objetivo de tener mínimo un valor $OD_{600} = 0.5$. Una vez alcanzada la OD_{600} deseada, se prosiguió a tomar el 2% de los 20 ml del precultivo y se lo inoculó en otros Erlenmeyer con un volumen de caldo específico para cada microorganismo, los cuales fueron 600 ml para *P. kudriavzevii*, 3.6 L para *S. cerevisiae*, 20 ml para *L. plantarum* y 800 ml para *A. ghanensis*, en las condiciones de incubación antes descritas. Para obtener la biomasa del cultivo iniciador se centrifugó por 10 min a 9000 rpm con una temperatura de 4 °C para formar el pellet. Después se utilizó una solución salina a una concentración de 0.1% para hacer un lavado del pellet obtenido y eliminar cualquier residuo del caldo, a excepción de *S. cerevisiae* para la cual se utilizó una solución de peptona al 0.1%,

1.2. Fermentación del cacao con reemplazo de pulpa y con cultivo iniciador

Para la fermentación del cacao se reemplazó su mucílago por una mezcla de fruta entre banano (*Musa x paradisiaca*) y maracuyá (*Passiflora edulis*). Cada fermentación tenía un 56% de granos de cacao y un 44% de pulpa de frutas, constituida por pulpa de maracuyá (89%) y banana (11%) (Carrión, 2019). El primer paso fue lavar las mazorcas de cacao CCN-51 y las frutas con agua clorada y jabón, eliminando partículas extrañas e impurezas. Una vez lavada la fruta, se abrió las mazorcas de cacao y el maracuyá con un cuchillo previamente desinfectado. Antes de homogenizar el cacao con la fruta, se eliminó la mayoría del mucílago del cacao con la ayuda de la enzima pectinasa (ROHAPECT PTE 100, Granotec) utilizando 0.5 ml por cada kilogramo de cacao. Se incubó por 30 min y se prosiguió a desprender el mucílago con la ayuda de trozos de gasa. Los pesos utilizados para la fermentación fueron 7.8 kg de cacao, 5,5 kg de maracuyá y 0.682 kg de banano, siendo así un total de 14 kg de mezcla. Esta se dividió en dos lotes de 7 kg, una para la fermentación de cacao espontánea y otra para la fermentación con el cultivo iniciador. Para ambos tipos de fermentación se utilizaron coolers de plástico, a los cuales se les adecuó para que pueda drenar el exudado de la mezcla. Para el cultivo iniciador se inoculó 4 log (UFC/g de masa de fermentación) de cada microorganismo, a excepción de *A. ghanensis*, ya que su crecimiento no fue tan eficaz como se esperaba y por lo tanto se estima que se inoculó un tercio de lo esperado. Las masas de cada microorganismo presente en el cultivo iniciador para los 7kg de cacao fueron: 0.867g de *A. ghanensis*, 0.130g de *L. plantarum*, 19.39 g de *S. cerevisiae* y 5.97g de *P. kudriavzevii*.

1.3. Optimización de medios de cultivo selectivos para la siembra de microorganismos durante la fermentación del cacao

Los medios utilizados para la siembra de microorganismos fueron probados mediante experimentación días antes de empezar la fermentación. En estos medios se emplearon tres tipos de antimicrobianos. La Natamicina se utilizó como antifúngico, para evitar el crecimiento de hongos y levaduras en los medios de cultivo para *L. plantarum* y *A. ghanensis*. El Cloranfenicol se utilizó para evitar el crecimiento de bacterias en el medio de *S. cerevisiae* y *P. kudriavzevii*. Para *A. ghanensis* se utilizó el medio GYC Agar, con 0.1% de Natamicina y 7% de alcohol. A este medio se le hirvió en vez de esterilizarlo en un autoclave, y una vez enfriado se le colocó el alcohol filtrado, con el fin de evitar que el alcohol se evapore. En el caso de *L. plantarum*, se utilizó medio MRS Broth, más 0.1% de Natamicina y 0.1% de Cisteína, ajustando el pH a 5.5 y por último añadiendo agar al 1.5%. Para *S. cerevisiae* y *P. kudriavzevii* se utilizó medio PDA con 100 mg/L de Cloranfenicol.

Cada día de fermentación se extrajo 20 g de muestra para después mezclarlo con 180 ml de agua peptonada, y homogenizarlo en el stomacher (SCIENTZ-11) por un tiempo de 3 min a una temperatura de 21 °C. Finalmente, se realizaron las diluciones seriadas especificadas en la Tabla 1, y se sembró 100 µl en placas Petri preparadas según lo descrito previamente. La incubación de levaduras fue de 24 h a 30 °C; las BAL se incubaron por 48 h a 35 °C en condiciones de anaerobiosis; y las BAA se incubaron a 40 °C por 120 h. Terminada la incubación fueron almacenadas a 4 °C hasta sus posteriores pruebas. Los datos del conteo de colonias de todas las placas, fueron registrados en una hoja de Excel, y se hizo una corrección de acuerdo a cada dilución sembrada para determinar las UFC/ml. Cabe destacar que, de ser posible, solo se seleccionó las diluciones que tenían un número de colonias entre 30 y 300.

Tabla 1

Diluciones sembradas cada día de fermentación en su respectivo medio de cultivo en la fermentación espontánea (FE) y en la del cultivo iniciador (CI).

| Días | FE | | | CI | | |
|------|-------------------------------------|-------------------------------------|-------------------------------------|---|-------------------------------------|-------------------------------------|
| | PDA | MRS | GYC | PDA | MRS | GYC |
| 0 | | 10 ⁻¹ → 10 ⁻³ | | 10 ⁻³ (10 ⁻⁴ no) → 10 ⁻⁹ | | |
| 1 | | 10 ⁻² → 10 ⁻⁴ | | 10 ⁻³ → 10 ⁻⁸ | | |
| 2 | | 10 ⁻³ → 10 ⁻⁵ | 10 ⁻¹ → 10 ⁻³ | 10 ⁻³ → 10 ⁻⁶ | | 10 ⁻¹ → 10 ⁻⁶ |
| 3 | 10 ⁻⁴ → 10 ⁻⁶ | 10 ⁻³ → 10 ⁻⁵ | 10 ⁻¹ → 10 ⁻⁴ | 10 ⁻⁵ → 10 ⁻⁷ | 10 ⁻³ → 10 ⁻⁶ | 10 ⁻¹ → 10 ⁻⁵ |
| 4 | 10 ⁻³ → 10 ⁻⁵ | 10 ⁻³ → 10 ⁻⁵ | 10 ⁻¹ → 10 ⁻⁵ | 10 ⁻⁵ → 10 ⁻⁷ | 10 ⁻³ → 10 ⁻⁶ | 10 ⁻¹ → 10 ⁻⁶ |
| 7 | 10 ⁻⁵ → 10 ⁻⁷ | 10 ⁻⁴ → 10 ⁻⁶ | 10 ⁻¹ → 10 ⁻⁵ | 10 ⁻⁵ → 10 ⁻⁷ | 10 ⁻⁴ → 10 ⁻⁶ | 10 ⁻¹ → 10 ⁻⁵ |

1.4. Registro de temperatura y pH

Comenzando desde el día 0 de fermentación, se registró la temperatura con un Data Logger (GSP-5, Elitech). También se hicieron análisis del pH tanto de la pulpa como del grano. Para la medición del pH de la pulpa se utilizó un potenciómetro (PH60S-Z, Apera Instruments) previamente calibrado y se hizo la lectura directa. Para el caso del pH del grano, se realizó un pelado manual, seguido por la trituration de estos en un molino de café (GX4100, Krups). Una vez triturado se pesó 5 g de la muestra y se dejó en remojo con un volumen de 50 ml de agua destilada por 30 min. Por último, se realizó la lectura en el potenciómetro para líquidos (Seven Compact, Mettler Toledo).

1.5. Pruebas moleculares para identificación de microorganismos

Seleccionadas las placas Petri con el número de colonias adecuadas para llevar a cabo los análisis moleculares, se realizaron pruebas de PCR con el objetivo de identificar si los microorganismos presentes en las muestras de cacao, coincidían con los microorganismos inoculados con el cultivo iniciador. Previa a este ensayo, se realizaron varias pruebas para evaluar el método más directo y sencillo para llevar a cabo las reacciones de PCR. Se probó empleando los siguientes moldes para la reacción: ADN extraído de los microorganismos (previamente crecidos en caldos), pellets de células diluidas 1:5 y 1:10, y colonias picadas directamente de las placas Petri. Después de varias pruebas se decidió utilizar el método de “colonias” para *L. plantarum* y *A. ghanensis*. En el caso de las levaduras se utilizó el método tradicional de extracción de ADN (Purelink Genomic DNA Mini Kit, Invitrogen). Las reacciones de PCR se realizaron utilizando el primer GTG-5 para las bacterias, y la pareja de primers TtRNA^{Sc} /5CAG para las levaduras (De Vuyst et al., 2008; Nisiotou., 2022). Las reacciones se realizaron con un termociclador (Miniamp plus, Thermo Fisher Scientific) usando distintos programas para las bacterias y las levaduras. Para las primeras el programa consistió en una desnaturalización inicial a 94°C por 4 min, seguido por 30 ciclos de una desnaturalización a 95°C por 30 s, alineamiento a 45°C por 1 min y una extensión a 72°C por 8 min, terminando la PCR con un ciclo de extensión final a 72°C por 16 min. Para las levaduras se utilizó un programa compuesto por una desnaturalización inicial a 95°C por 5 min, seguido por 35 ciclos de una desnaturalización a 95°C por 1 min, alineamiento a 50°C por 1 min y una extensión a 72 °C por 1 min y 30 s, terminando la PCR con un ciclo de extensión final a 72°C por 10 min. Finalmente, los resultados se evaluaron mediante electroforesis en geles de agarosa al 1.5% aplicando 100 V por 2 h, y registrando las fotos en un foto documentador (Labnet, ENDURO™ GDS TOUCH). Cabe recalcar que antes de realizar el gel de

electroforesis de los productos de PCR de las levaduras, se hizo una cuantificación por espectrofotometría (Epoch, BioTeK) del ADN extraído.

1.6. Prueba de corte

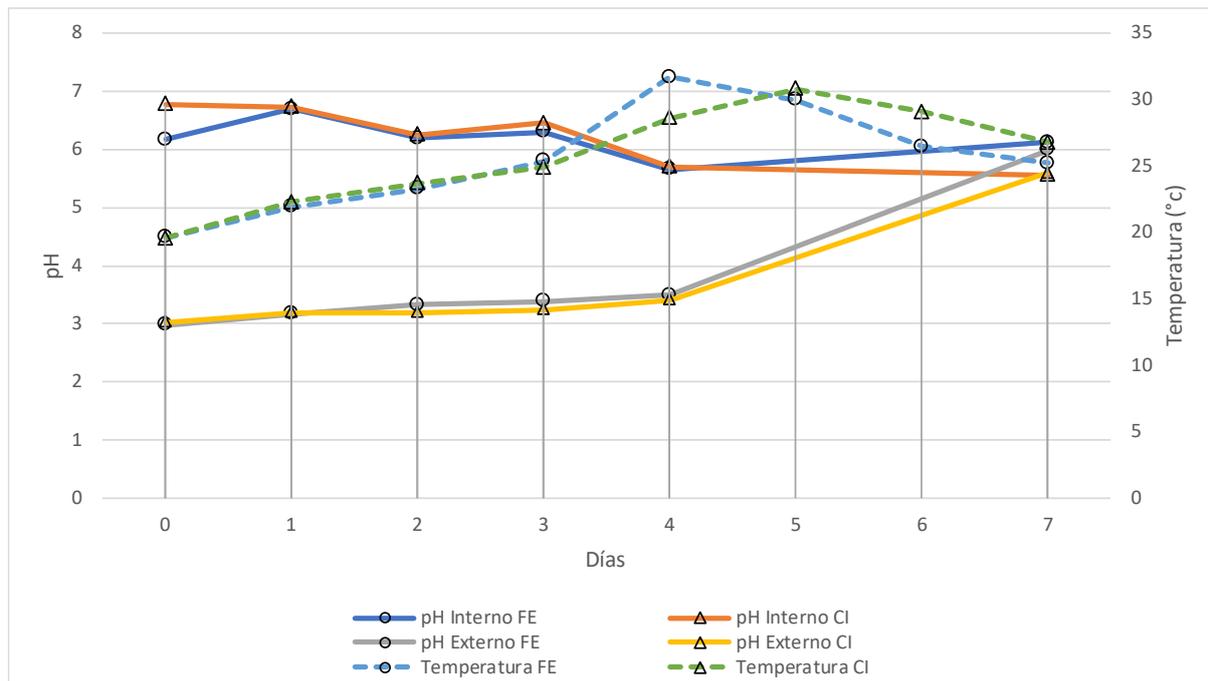
Transcurrido los siete días de fermentación, se secaron los granos de cacao en la cámara de secado marca (Tecnoplast) a una temperatura de 50°C. A partir de las 24 h se midió la humedad de los granos con un higrómetro (SKZ Industrial, SKZ111B-2) hasta que alcance un valor inferior a 9%. Una vez que la humedad se encontró dentro del rango, se prosiguió a tomar una muestra de 50 granos, y con la ayuda de una guillotina para cacao se realizó un corte por la mitad de los granos. Finalmente, se pudo analizar el color del interior del grano y la presencia de surcos, para poder determinar la calidad de fermentación de los granos obtenidos con CI y con FE, según los criterios establecidos en la NTE INEN 176 (2021).

CAPÍTULO II – RESULTADOS Y DISCUSIÓN

2.1. Análisis de temperatura y pH

La medición del pH mostró variaciones mínimas en el caso del pH interno de los granos de cacao y variaciones considerables en el pH de la pulpa, tanto en la fermentación espontánea como la del cultivo iniciador (Figura 1).

Figura 1. Análisis del pH y temperatura de la fermentación espontánea (FE) y del cultivo iniciador (CI) y de los granos de cacao



Se puede apreciar que la disminución de pH interno es leve durante los tres primeros días. En el tercer día se puede evidenciar una mayor variación, ya que el pH bajó aproximadamente de 6.3 a 5.66, tanto en FE como en CI. La fermentación terminó al séptimo día con un pH interno de 5.56 en el caso del cultivo iniciador y un pH interno de 6.12 para la fermentación espontánea. En el caso del pH de la pulpa, compuesta por maracuyá y banano, se puede observar una mínima variación hasta el día 4 en ambos tipos de fermentación. A partir del día 4, el pH comenzó a aumentar, terminando la fermentación con un valor de 6 aproximadamente para la FE, y un valor de 5.6 para el CI.

Analizando los resultados, se puede observar que, a partir del tercer y cuarto día de fermentación, el pH comienza a variar de manera más significativa, tanto internamente como externamente. Desde el cuarto día el pH externo comienza a aumentar en FE y CI, pudiendo ser debido a la migración de los ácidos hacia el interior del grano y provocando así la disminución del pH en el interior de este, lo que se aprecia más claramente para CI. Este comportamiento de los ácidos se ha descrito como clave para provocar la muerte del embrión (Mosquera et al., 2020; Rodríguez-Velázquez et al., 2022). En fermentaciones espontáneas se han encontrado pH internos del grano entre 5.19 y 5.26, considerado un rango correcto de una buena fermentación (Mosquera et al, 2020; Chávez-Salazar et al., 2023; Sipe & Rodríguez., 2023). En otros casos se han encontrado valores de fermentaciones en cajones que comienzan

en 6.46 desde el día 0, y disminuyen progresivamente hasta el día 6 de fermentación, acabando con un pH interno de 4.45 (Chávez-Salazar et al., 2023). Comparando estos resultados con los obtenidos en la presente investigación, es claro que la poca variación pH observada en el grano conlleva a un valor más alto (pH 6.12) que los reportados por otros autores. En caso de fermentaciones con CI se han encontrado pH externos que van desde 3, hasta terminar la fermentación con 5.5 (Sandhya et al., 2016, Díaz-Muñoz et al., 2021). No obstante, es importante indicar que estos experimentos no tuvieron un reemplazo del mucílago del cacao por pulpas de frutas, por lo tanto, las diferencias observadas se podrían deber a la distinta composición de azúcares, ácidos, vitaminas y otros nutrientes entre el mucílago y las pulpas utilizadas.

Durante la fermentación del cacao ocurren reacciones exotérmicas, es decir, que liberan calor, por lo que se espera un aumento progresivo de la temperatura, pudiendo llegar a alcanzar hasta aproximadamente los 50 °C (Lima et al., 2021). Se puede observar que ambas fermentaciones analizadas en el presente trabajo mostraron un comportamiento similar (Figura 1). Para el caso de FE, la temperatura aumenta de manera progresiva hasta el día 4, donde alcanza su máxima temperatura de 31.7°C, disminuyendo luego hasta una temperatura de 25.22°C en el día 7. En el caso del CI, la variación de temperatura es similar a la de FE, a diferencia que esta alcanza una temperatura máxima de 30.8°C en el quinto día de fermentación. Se puede observar que existe un desfase hasta alcanzar la máxima temperatura en cada fermentación. A partir del quinto día es evidente la caída de temperatura hasta el séptimo día, terminando con una temperatura de 26.8 °C. Cabe recalcar que ambos cajas térmicas se mantuvieron en las mismas condiciones ambientales.

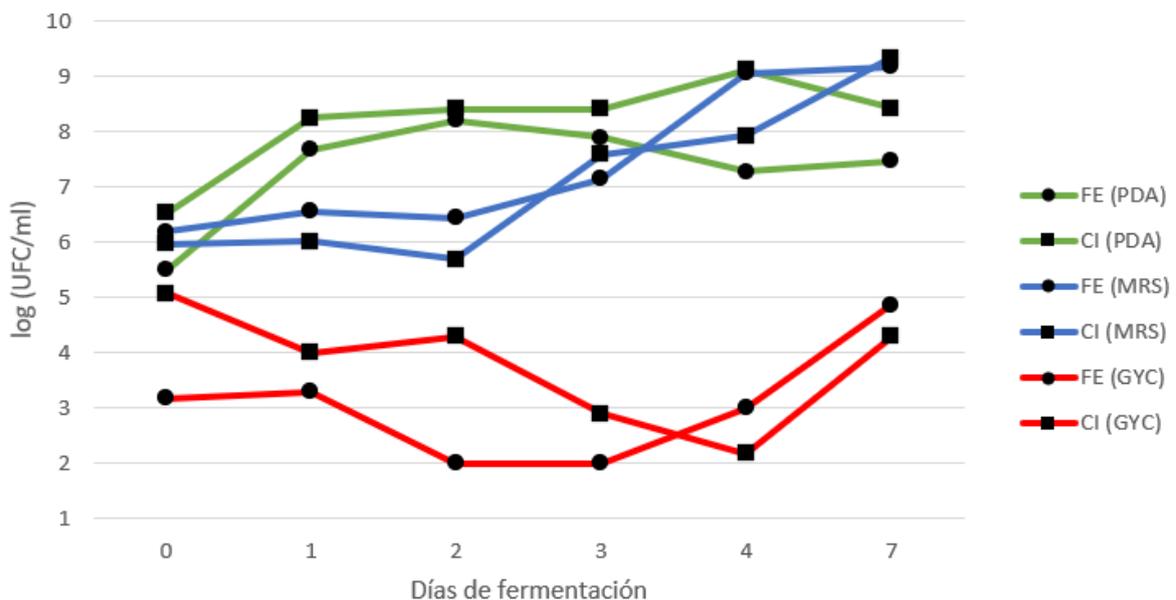
En fermentaciones con CI se han reportado valores de temperatura que empiezan a 24°C desde el día 0, y aumentan hasta 32°C durante un periodo de 4 días, considerando que las masa total de fermentación que se utilizó fueron de 20kg (Díaz-Muñoz et al., 2021). Por otro lado, en fermentaciones espontáneas llevadas a cabo en cajas y coolers, pueden ir desde los 31°C al inicio y llegar hasta 52,30°C terminando la fermentación, obteniendo como promedio 40°C (Chávez-Salazar et al., 2023; Sipe & Rodríguez., 2023). Analizando las medidas obtenidas en la fermentación realizada en el presente experimento, tanto en FE como en CI, se observa que en ambos casos las diferencias de temperaturas no son muy grandes entre estas dos, aunque si existe una diferencia mínima, sobre todo en el último día de fermentación. Las diferencias de los resultados encontrados en este trabajo, con los mencionados en otros experimentos puede

ser debido a la masa total de fermentación utilizada (7kg), el material del cooler, y las condiciones climáticas de la región donde se realizó el experimento.

2.2 Dinámica de crecimiento de microorganismos

Una vez terminado el periodo de incubación para cada tipo de microorganismo, se procedió a seleccionar las placas para la toma de fotografías y el conteo de colonias. Los resultados se presentan en la figura 2.

Figura 2. Dinámica de crecimiento de presuntas levaduras, BAA y BAL (FE – Fermentación espontánea; CI – Cultivo iniciador)



En el medio PDA se puede apreciar una clara diferencia entre el número de microorganismos al inicio de la fermentación, ya que en FE hay un aproximado de 5,5 log (UFC/ml), mientras que en CI hay un aproximado de 6,5 log (UFC/ml). Estos números aumentan de manera progresiva, donde en el caso de FE, alcanza un máximo de 8,1 log (UFC/ml) en el segundo día y en el caso de CI, el número de microorganismos aumenta hasta el cuarto día con un aproximado de 9 log (UFC/ml). Finalmente, en el día 7 acaban con la misma diferencia de microorganismos con la que empezaron el día 0, es decir, con una diferencia de 1 log (UFC/ml), siendo mayor el número de levaduras en CI. Estos resultados indican que la inoculación de levaduras en el CI tuvo un efecto notable tanto en la abundancia de levaduras como en la dinámica de su crecimiento durante la fermentación (Moreira et al., 2017).

Una tendencia contraria a la de las levaduras se observó para el medio MRS, ya que el número de presuntas BAL casi siempre es mayor en FE que en CI, a excepción del día 3 donde CI supera al de FE, aunque la diferencia es mínima. Dejando de lado los conteos, se puede apreciar que la dinámica de crecimiento de las BAL tanto en FE como en CI son similares, a pesar de que el CI fue inoculado con 4 log (UFC/g) de *L. plantarum*.

Finalmente, en cuanto a la dinámica de crecimiento de las presuntas BAA en medio GYC, hay una clara evidencia que hubo un mayor número de microorganismos en CI, comenzando con un número aproximado de 5 log (UFC/ml). En ambas fermentaciones la dinámica es similar, aunque en los días 3 y 4 hay un descenso de microorganismos en el caso de CI, mientras que en FE se evidencia un ligero aumento. A partir de esos días comienza un aumento rápido de bacterias hasta el día 7. Hay que recordar que el número de *A. ghanensis* inoculados fue inferior al deseado, razón por la cual el número de UFC por ml es inferior a comparación de las levaduras y las BAL.

Estos resultados demuestran que las levaduras son las que mostraron mayor prevalencia desde el día 0, seguidas por las presuntas BAL y BAA, tanto en FE como en CI. Comparando estos resultados con la fermentación montada por Díaz-Muñoz et al (2021), la dinámica de crecimiento de colonias en cada medio, fueron diferentes, ya que en ese caso predominaron BAL, seguidas por BAA y levaduras. Cabe destacar que en la investigación recién mencionada el cultivo iniciador empleado contenía cantidades similares de levaduras y BAL que las utilizadas en el presente trabajo.

Para FE, según Lefeber et al (2011) y Rodríguez-Velázquez et al (2022), las bacterias que predominan desde un inicio son BAL, seguidas por levaduras por un tiempo corto, para después ser superadas por BAA. De igual manera podemos ver que en esta fermentación hay un número de proliferación de microorganismos totalmente diferente en FE a lo descrito por los autores mencionados anteriormente. Esta diferencia de microorganismos puede ser debido a las condiciones de fermentación como las temperaturas que se dio cada día, las cuales no fueron las más óptimas, al tipo de cacao, el lugar de origen del fruto y al reemplazo del mucílago propio del cacao por pulpa de fruta.

2.3. PCR y tinciones

Los resultados de las pruebas de PCR y tinciones realizadas a las colonias presentes en cada medio mostraron presencia de otros microorganismos diferentes a los inoculados con el CI,

debido a sus diferentes bandas en la electroforesis y tinciones con respecto a los controles. Estos resultados se describen a continuación para cada grupo de microorganismos.

Presuntas BAA en medio GYC del cultivo iniciador

Se observó un número reducido de colonias en el medio GYC y, en consecuencia, el número de reacciones de PCR y tinciones realizadas fueron menos en comparación con los otros grupos de microorganismos.

Analizando los resultados de las tinciones, se puede observar que existen colonias que son Gram positivas como la 0, 3-Ca, 4-Cb y 4-Ca y por lo tanto dejarían de ser candidatas para ser una bacteria ácido acética (Tabla 2). El resto de las colonias como la 1, 2, 3-Cb, 7-Cp y 7-Cg corresponden a bacterias Gram negativas, mismo tipo que *A. ghanensis*.

Tabla 2

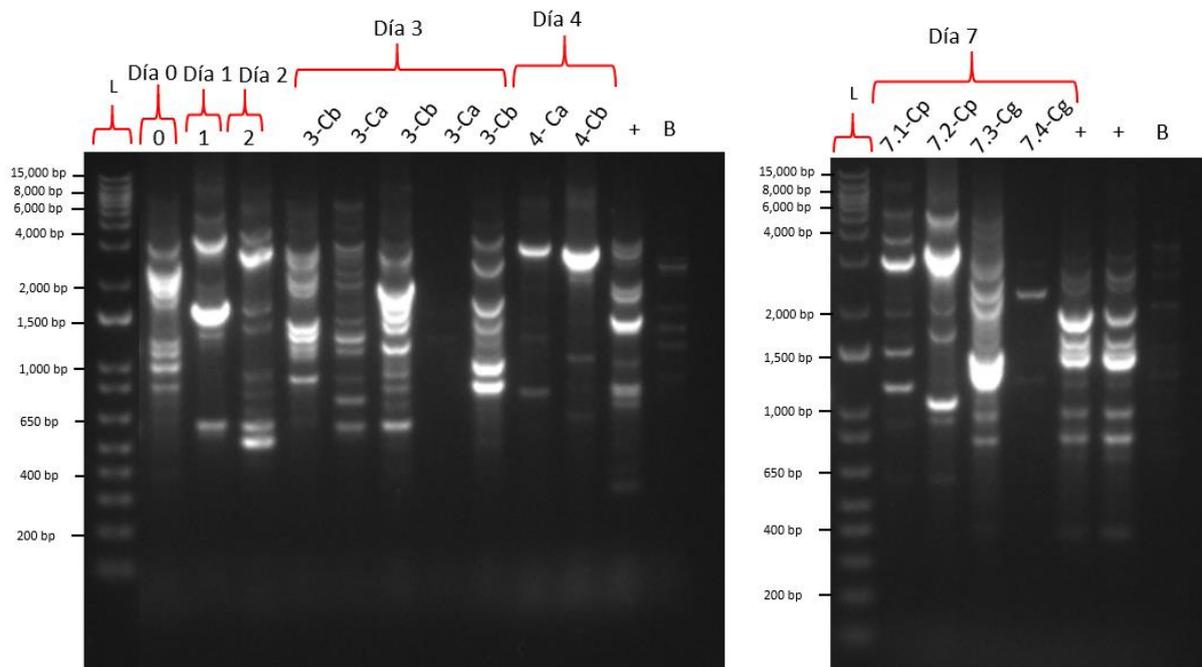
Tinciones de colonias presentes en medio GYC del CI

| Día | Código | Gram (+/-) | Descripción |
|-----|--------|------------|---|
| 0 | 0 | + | •Colonia blanca redonda •Estreptobacilo |
| 1 | 1 | - | •Colonia blanca redonda •Espiroquetas |
| 2 | 2 | - | •Colonia blanca pequeña redonda •Bacilos |
| 3 | 3-Cb | - | •Colonia blanca •Bacilos |
| | 3-Ca | + | •Colonia amarilla •Bacilos |
| 4 | 4-Cb | + | •Colonia blanca •Estreptococos |
| | 4-Ca | + | •Colonia amarilla •Estreptococos |

| | | | |
|------------------|------|---|-------------------------------------|
| 7 | 7-Cp | - | •Colonia pequeña •Espiroquetas |
| | 7-Cg | - | •Colonia grande •Espiroquetas |
| Control positivo | + | - | •Colonia blanca redonda •Bacilos |

Figura 3. Electroforesis de PCR de colonias presentes en medio GYC del CI.

L, Ladder TrackIt™ 1 Kb Plus; +, *A. ghanensis*; B: blanco sin molde



Comparando estas colonias, en el gel de electroforesis (Figura 3), se puede constatar que, a pesar de ser Gram negativas, no tienen ninguna similitud con el control positivo (+), a excepción de la colonia 3- Cb, la cual tiene bandas similares (pero no idénticas) a *A. ghanensis*, además de tener la misma forma bajo el microscopio. Cabe recalcar que los días 3, 4 y 7, presentaron varias colonias en las placas Petri, razón por la cual se hicieron varias pruebas para esos días picando colonias similares entre ellas y dándoles codificaciones en base al día de proliferación y al tamaño de colonia o color (Ejemplo: 3(día)-Cb (Colonia blanca)), para después constatar si se trataban de un mismo grupo de bacterias. El resultado es que los

patrones de bandas difieren entre colonias en apariencia similares desde el punto de vista macro y microscópico (Figura 3 y tabla 2).

Tomando en cuenta el número reducido de BAA inoculadas en el CI y los resultados arrojados por las PCR y los geles de electroforesis, se podría decir que *A. ghanensis* no se encontró con la metodología aplicada. También fue evidente la poca eficacia del medio selectivo al tener la presencia 3 bacterias Gram positivas. No obstante, no se puede descartar que *A. ghanensis* se encontrara en niveles inferiores a los que permite detectar la metodología empleada. Al encontrar bacterias Gram negativas en el medio GYC cuya morfología es similar a BAA, se podría especular que se trata de especies como *A. pasterianus*, *A. syzygii*, *A. tropicalis*, *A. lovaniensis* o *A. senegalensis* ya identificadas en otras fermentaciones (Luc De Vuyst., 2008; Lefeber et al., 2011; Díaz-Muñoz et al., 2021). Para estos microorganismos no identificados se podrían hacer estudios metagenómicos mediante técnicas como DGGE, RFLPs, qPCR, y análisis de la región 16s con NGS, los cuales ya han sido implementados en otros experimentos (Cocom., 2021)

Presuntas BAL en medio de cultivo MRS del cultivo iniciador

En el caso de las BAL, se obtuvo un mayor número de colonias y una mayor diversidad de estas en comparación con los cultivos en medio GYC. Para estudiar en más detalle esta diversidad, las pruebas de PCR se realizaron por triplicado considerando que había colonias similares en tamaño y forma.

Analizando los resultados, las colonias R0, Bg0, R1, P1, Rp2, Rg2, Rg3, C4, B4, Cp4, p7, Rp7 y Rg7 mostraron ser Gram negativas (Tabla 3) por lo cual se descartó la probabilidad de que sean *L. plantarum*, ya que esta es Gram positiva con forma de bacilos. Dentro de las colonias que cumplen con las características de *L. plantarum* están las colonias de color amarillo como A1, P3 y A7.

Tabla 3

Tinciones de colonias presentes en medio MRS del CI

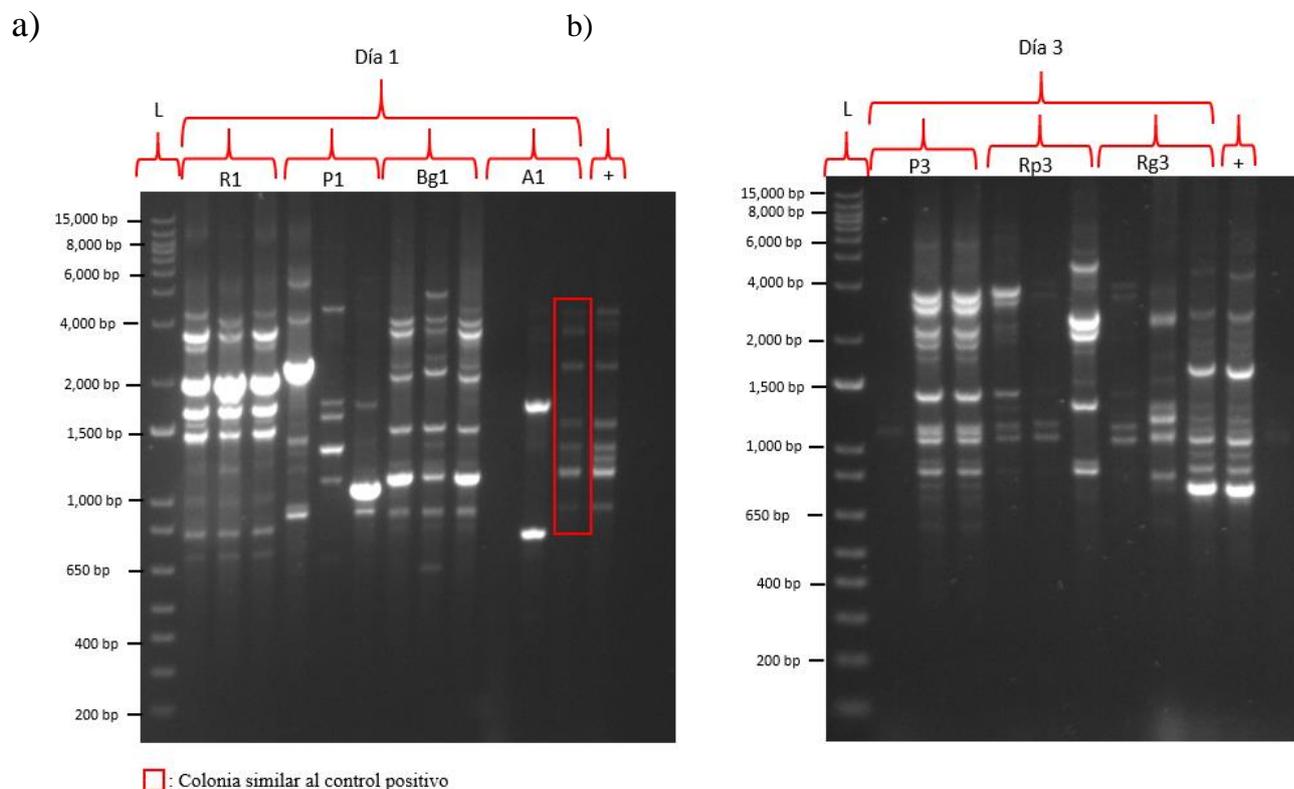
| Día | Código | Gram (+/-) | Descripción |
|-----|--------|---------------|---|
| 0 | A0 | + | • Colonia amarilla • Bacilos |
| | R0 | - | • Colonia Rosada • Bacilos |
| | Bp0 | + | • Colonia blanca pequeña • Estreptobacilos |
| | Bg0 | - | • Colonia blanca grande • Diplobacilos |
| 1 | A1 | + | • Colonia amarilla • Diplobacilos |
| | R1 | - | • Colonia rosa • Estreptobacilos |
| | P1 | - | • Colonia pálida • Cocobacilos |
| | Bg1 | + | • Colonia blanca grande • Estreptobacilos |
| 2 | A2 | + | • Colonia amarilla • Espiroqueta |
| | Bg2 | + | • Colonia blanca grande • Espiroqueta |
| | Rp2 | - | • Colonia rosa pequeña • Estreptobacilos |
| | Rg2 | - | • Colonia rosa grande • Estreptobacilos |
| 3 | Rp3 | + | • Colonia rosa pequeña • bacilos |
| | Rg3 | - | • Colonia rosa grande • Cocobacilos |

| | | | |
|------------------|-----|---|--|
| | P3 | + | <ul style="list-style-type: none"> •Colonia pequeña •Bacilos |
| 4 | C4 | - | <ul style="list-style-type: none"> • Colonia café •Estreptobacilos |
| | B4 | - | <ul style="list-style-type: none"> •Colonia blanca • Bacilos |
| | Cp4 | - | <ul style="list-style-type: none"> •Colonia café pequeña •Bacilos |
| 7 | p7 | - | <ul style="list-style-type: none"> •Colonia pálida •Cocobacilos |
| | A7 | + | <ul style="list-style-type: none"> •Colonia amarilla • Estreptobacilos |
| | Rp7 | - | <ul style="list-style-type: none"> • Colonia rosa pequeña • Bacilos |
| | Rg7 | - | <ul style="list-style-type: none"> • Colonia rosa grande •Bacilos |
| Control Positivo | + | + | <ul style="list-style-type: none"> • Colonia blanca pequeña • Bacilos |

En los geles de electroforesis (Figura 4 y anexo 4), se muestran pruebas de PCR por triplicado, con el propósito de saber si las colonias con similitudes en cuanto a tamaño y color pertenecían a la misma especie o cepa. Se puede apreciar en la figura 4, que las diferentes colonias que proliferaron en el día 1 (a) y en el día 3 (b) poseen aproximadamente los mismos patrones de banda que el control positivo en una de las colonias A1, permitiéndonos decir que se podría tratar de *L. plantarum*, aunque de diferentes cepas. Respecto a las otras colonias se puede apreciar que, a pesar de tener las mismas características morfológicas, difieren a nivel molecular a juzgar por sus patrones de bandas en la electroforesis.

Figura 4. Electroforesis de PCR de colonias presentes en medio MRS del CI.

L, Ladder TrackIt™ 1 Kb Plus; +, *L. plantarum*



Para las demás colonias Gram positivas el patrón de bandas y las formas de las bacterias son diferentes a *L. plantarum*. Revisando el número de estas colonias diferentes que proliferaron cada día, existe una mayor variabilidad durante los días 0, 1, 2 y 3 de fermentación, pudiéndose tratar de BAL como *L. fermentum*, *Fructobacillus pseudoficulneus*, *Weissella ghanensis*, *W. fabalis*, y *W. fabaria*, las que se han reportado en otras fermentaciones (Lefeber et al., 2011; Díaz-Muñoz et al., 2021). De igual manera se podría investigar mediante estudios metagenómicos para comprobar de que bacterias se trata.

Levaduras

Para este grupo de microorganismos que resultó ser el más predominante, se realizó pruebas de PCR y gels de electroforesis tanto para el CI como para la FE, con el objetivo de constatar si alguno de los microorganismos encontrados en fermentación espontánea coincidía con los inoculados en el cultivo iniciador.

En la tabla 4, se observa que hubo diez colonias con forma “ovoide”, característica de *P. kudriavzevii*, las cuales son 1, 3, 5, 8, 10, 11, 13, 15, 16 y 17. Analizando estas colonias con su

respectivo código en la figura 5, se observa que todas las colonias ya mencionadas coinciden con el patrón de bandas del control positivo de *P. kudriavzevii* (159), a excepción de tres, la colonia 3, 12 y 17. Estas 3 colonias diferentes, a pesar de tener una forma similar a *P. kudriavzevii*, son iguales entre ellas a nivel molecular y por lo tanto se trataría de otra levadura. Con respecto al resto de colonias, todas presentan una forma de coco, característica de *S. cerevisiae*. A través del gel de electroforesis podemos determinar que las colonias 2, 4, 6, 7, 9, 14 y 18 coinciden con el patrón de bandas del control positivo de *S. cerevisiae* (158), y por lo tanto se puede decir que estuvo presente durante todos los días de fermentación, a comparación de *P. kudriavzevii*, la cual estuvo presente solo hasta el día 4. La colonia 12, a pesar de tener la misma forma que *S. cerevisiae*, no coincide con el patrón de bandas de esta misma a nivel molecular. Es importante observar que a partir del día 0, solo se encuentran presentes las dos levaduras inoculadas, y a partir de los siguientes días proliferan nuevas levaduras, debido a una posible contaminación del ambiente, frutas y las mismas mazorcas de cacao

Tabla 4

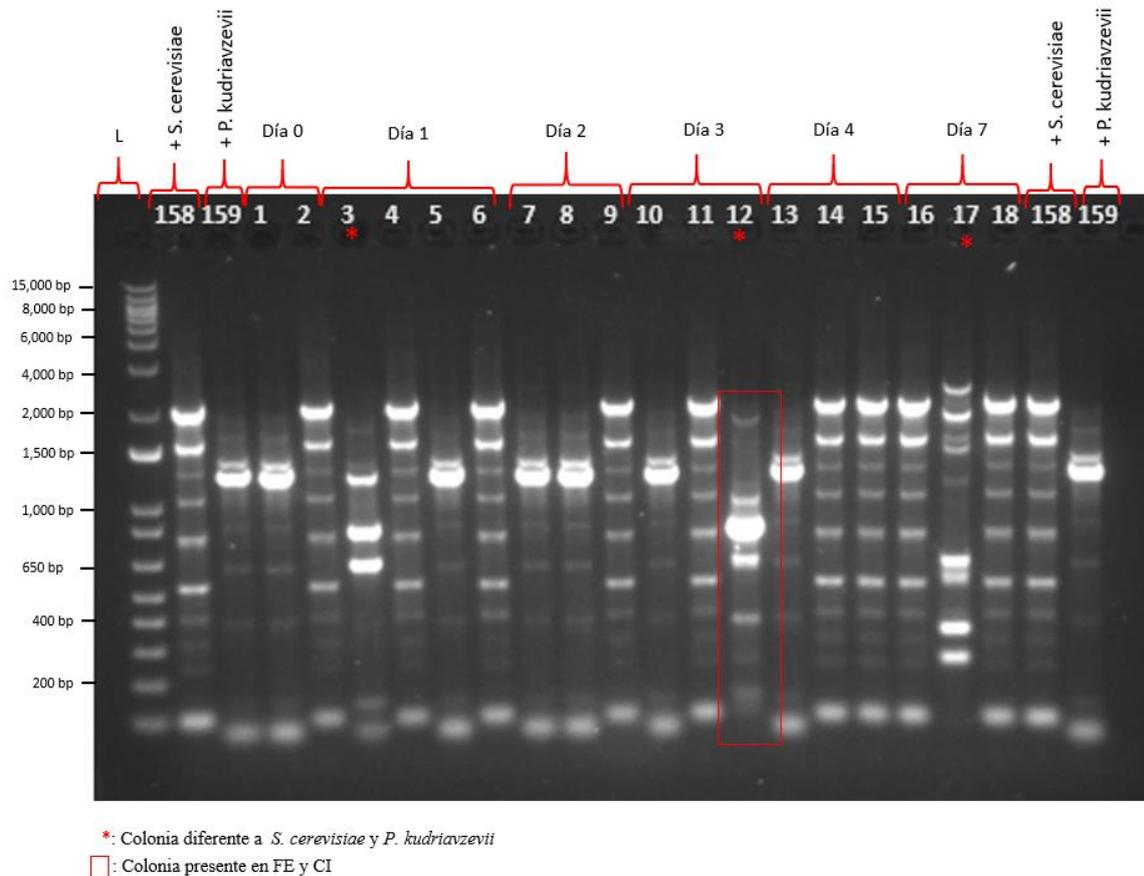
Tinciones de colonias presentes en medio PDA del CI

| Día | Código | Descripción |
|-----|--------|--|
| 0 | 1 | •Colonia grande blanca •Forma Ovoide |
| | 2 | •Colonia pequeña blanca •Forma de Coco |
| 1 | 3 | •Colonia grande blanca •Forma de Ovoide |
| | 4 | •Colonia pequeña blanca •Forma de Coco |
| | 5 | •Colonia grande blanca •Forma Ovoide |
| | 6 | •Colonia pequeña blanca •Forma de Coco |
| 2 | 7 | •Colonia pequeña blanca •Forma de Coco |
| | 8 | •Colonia grande blanca |

| | | |
|------------------------|-----|---|
| | | •Forma Ovoide |
| | 9 | •Colonia pequeña blanca •Forma de Coco |
| 3 | 10 | •Colonia grande blanca •Forma Ovoide |
| | 11 | •Colonia grande blanca •Forma Ovoide |
| | 12 | •Colonia pequeña blanca •Forma de Coco |
| 4 | 13 | •Colonia grande blanca •Forma Ovoide |
| | 14 | •Colonia pequeña blanca •Forma de Coco |
| | 15 | •Colonia grande blanca •Forma Ovoide |
| 7 | 16 | •Colonia grande blanca •Forma Ovoide |
| | 17 | •Colonia grande blanca •Forma Ovoide |
| | 18 | •Colonia pequeña blanca •Forma de Coco |
| <i>S. cerevisiae</i> | 158 | •Colonia pequeña blanca •Forma de Coco |
| <i>P. kudriavzevii</i> | 159 | •Colonia grande blanca •Forma Ovoide |

Figura 5. Electroforesis de PCR de colonias presentes en medio PDA del CI.

L, Ladder TrackIt™ 1 Kb Plus



Los resultados de las PCR y tinciones realizadas de las colonias que proliferaron durante la FE, se muestran a continuación en la figura 6, tabla 5 y anexo 6.

Analizando las tinciones, se observó que la mayoría de colonias presentes en la FE, presentan similitud en cuanto a la forma de *P. kudriavzevii*, a excepción de la colonia 11 la cual posee forma de coco, característico de *S. cerevisiae* (Tabla 5). En la figura 10 se puede observar que las colonias 4 y 9 poseen el mismo patrón de bandas que el control positivo de *P. kudriavzevii* (159). Para la única colonia con forma de coco, la colonia 11, supuesta *S. cerevisiae*, no coincidió con el patrón de bandas del control positivo de esta misma. Por lo tanto, solo hubo presencia de *P. kudriavzevii* el día 3 y 4 en FE. Por otro lado, las colonias 2, 5 y 13 poseen el mismo patrón de bandas que la colonia 12 del CI. A pesar de que no pertenecen a ninguna de las dos levaduras del CI, este microorganismo está presente en ambas fermentaciones y por lo tanto sería candidata para realizar una secuenciación de ADN, haciendo extracción de ADN, pruebas de PCR y utilizando primers específicos para secuenciar los genes 16s y 26s rRNA, para después compararlo con las presentes en “Gen Bank”, o mediante ITS (Internal

Transcribed Spacer) (Visintin et al., 2016; Viesser et al., 2020), con el fin de saber de qué levadura se trata.

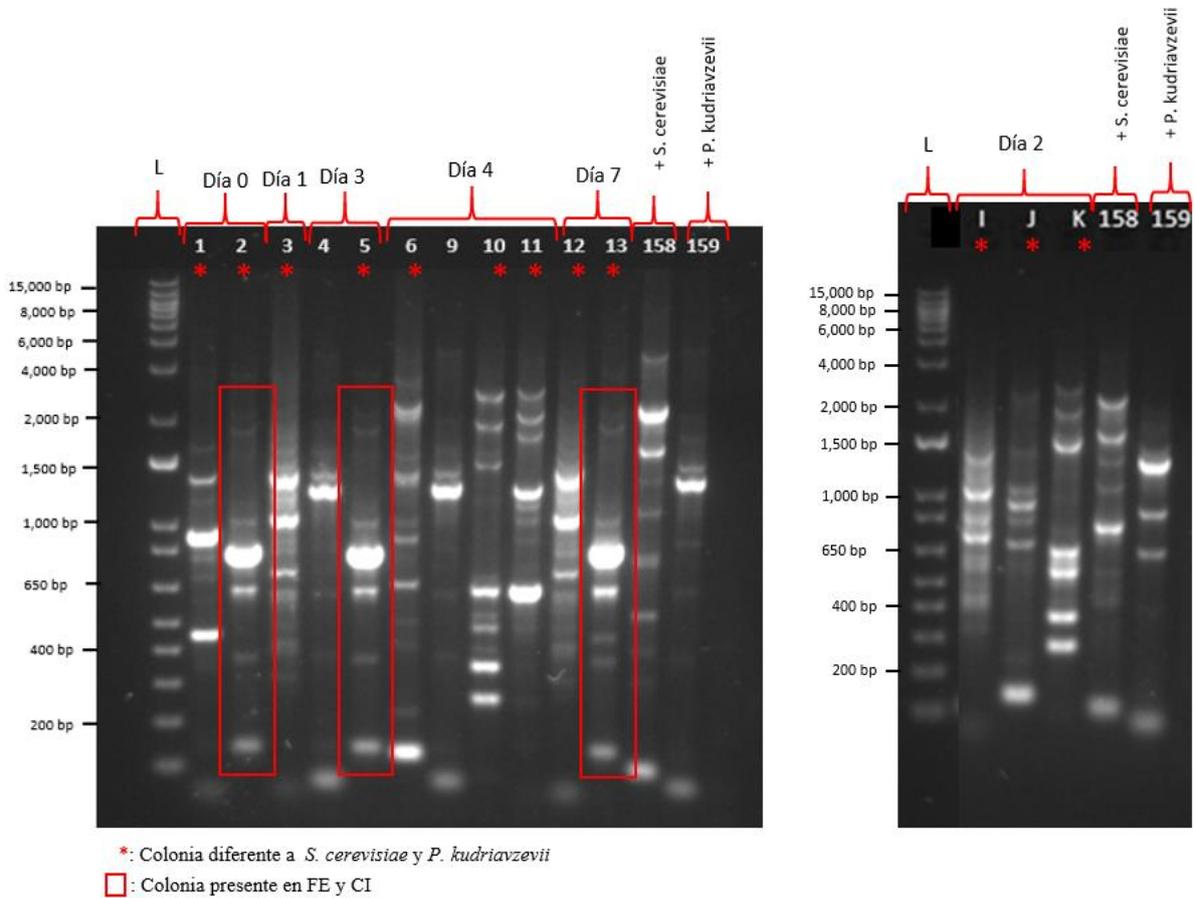
Tabla 5

Tinciones de colonias presentes en medio PDA de FE

| Día | Código | Descripción |
|-----|--------|--|
| 0 | 1 | •Colonia grande blanca • Forma Ovoide |
| | 2 | •Colonia grande blanca • Forma Ovoide |
| 1 | 3 | •Colonia grande blanca • Forma Ovoide |
| 2 | I | •Colonia grande blanca • Forma Ovoide |
| | J | •Colonia grande blanca • Forma Ovoide |
| | K | •Colonia grande blanca • Forma Ovoide |
| 3 | 4 | •Colonia grande blanca • Forma Ovoide |
| | 5 | •Colonia grande blanca • Forma Ovoide |
| 4 | 6 | •Colonia grande blanca • Forma Ovoide |
| | 9 | •Colonia grande blanca • Forma Ovoide |
| | 10 | •Colonia grande blanca • Forma Ovoide |
| | 11 | •Colonia pequeña blanca • Forma de Coco |
| 7 | 12 | •Colonia grande blanca • Forma Ovoide |

| | | |
|------------------------|-----|---|
| | 13 | <ul style="list-style-type: none"> • Colonia grande blanca • Forma Ovoide |
| <i>S. cerevisiae</i> | 158 | <ul style="list-style-type: none"> • Colonia pequeña blanca • Forma de Coco |
| <i>P. kudriavzevii</i> | 159 | <ul style="list-style-type: none"> • Colonia grande blanca • Forma Ovoide |

Figura 6. Electroforesis de PCR de colonias presentes en medio PDA de FE.
L, Ladder TrackIt™ 1 Kb Plus



2.4. Prueba de corte

Las pruebas de corte, mostraron una clara diferencia de la calidad de fermentación entre ambos casos, a juzgar por los diferentes tonos de colores observados (Figura 7).

Figura 7. Prueba de corte de granos de cacao CCN -51 proveniente de la fermentación espontánea (A) y fermentación con cultivo iniciador (B)

A)



B)



Leyenda:



En el caso de la fermentación con CI se observó una menor diferencia entre las tonalidades de los granos (Figura 7B). A simple vista se puede observar que hubo una mayor proporción de granos bien fermentados ya que poseen un color café y los surcos característicos de una fermentación óptima. También se puede observar que ningún grano resultó contaminado con

moho, y el resto resultó con un color violeta – café. En proporciones se obtuvo un 24% de granos bien fermentados, y un 76% de granos parcialmente fermentados.

En cuanto a la fermentación espontánea (Figura 7A) la mayoría de los 50 granos evaluados mostraron un color violeta – café, uno fue café, cuatro morados y uno estuvo contaminado con moho. En vista de esto, 88 % de granos resultaron parcialmente fermentados, un 2% de granos bien fermentados, 8 % mal fermentados, y 2% de granos contaminados.

A la luz de estos resultados, podemos determinar que evidentemente hubo una mejor fermentación en los granos de cacao que contenían el cultivo iniciador, debido a un porcentaje más alto de granos color café con surcos (24%), que los granos que tuvieron una fermentación espontánea (2%). Comparando estos resultados con los requisitos de calidad impuesto por la NTE INEN 176, los granos fermentados obtenidos de la FE no cumplen con los parámetros establecidos, ya que para granos de cacao “grado 3” (menor calidad) requieren un mínimo de 53% de granos bien fermentados, un máximo de 18 granos pizarrosos 25% de granos violetas. Por último, para la fermentación con CI, estaría cumpliendo con los parámetros para granos de cacao “grado 1” (mayor calidad), ya que la norma pide un mínimo de 75% de granos fermentados o parcialmente fermentados.

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

El uso del cultivo iniciador en la fermentación del cacao no mostró gran influencia en la temperatura y pH de los granos, en comparación de la FE, ya que tienen casi el mismo comportamiento. De acuerdo con los resultados reportados, tanto en FE como CI predominaron levaduras seguidas de BAL y BAA. Esto podría explicarse por la temperatura del ambiente y los nutrientes disponibles para los 3 tipos de microorganismos. Las tinciones y pruebas de PCR permitieron monitorear los microorganismos del CI durante los 7 días de fermentación. Para *A. ghanensis*, la electroforesis no mostró ninguna colonia con el mismo patrón de bandas del control positivo, por lo tanto, no es segura su presencia a lo largo de la fermentación. Para *L. plantarum*, se encontró dos colonias que coincidían aproximadamente con el control positivo de esta, una presente en el día 1 y otra en el día 3. Por último, las levaduras fueron las que mayormente prevalecieron a la largo de la fermentación con CI, en especial *S. cerevisiae*, estando presente todos los días de fermentación.

Por otro lado, la prueba de corte mostró una clara diferencia en cuanto al porcentaje de granos bien fermentados, obteniendo un 24% de granos bien fermentados en CI frente a un 2% de granos en FE. Es importante tomar en cuenta que la fermentación con CI tuvo un mayor tiempo de secado que FE.

Para comprender en mayor profundidad la actividad del cultivo iniciador, se recomienda hacer pruebas para determinar los compuesto volátiles desarrollados mediante métodos de cromatografía de gases. Además, para evaluar en mayor profundidad la dinámica y abundancia de microorganismos, sería necesario realizar secuenciaciones de la región 16S rRNA, ASV o ITS con el fin de identificar los microorganismos que no coincidieron con los inoculados. También sería valioso complementar el set de datos con análisis bromatológicos, como humedad, grasa, cenizas y cuantificación de azúcares entre otros.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICA

- 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).
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S240584401935830X>
- 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, 1101-1110.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4837722/>
- Camu, N., De Winter, T., Verbrugghe, K., Cleenwerck, I., Vandamme, P., Takrama, J. S., ... & 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://journals.asm.org/doi/full/10.1128/aem.02189-06>
- Carrión Aguilar, A. S. (2019). Efecto de la adición de pulpa de maracuyá y banano como coadyuvantes en la fermentación de granos de cacao de la variedad CCN-51 (Bachelor's thesis, Universidad del Azuay).
<https://dspace.uazuay.edu.ec/handle/datos/8684>
- Cocom Cantú, B. A. (2021). Estudio del proceso de fermentación de los granos de cacao (*Theobroma cacao* L.) en México. Universidad de Almería.
<https://dialnet.unirioja.es/servlet/dctes?codigo=288218>
- Chávez-Salazar, A., Guevara-Pérez, A., Encina-Zelada, C., Vidaurre-Rojas, P., & Muñoz-Delgado, V. (2023). Condiciones de fermentación y secado en las características físico químicas del cacao (*Theobroma cacao* L.) Cultivar CCN 51. *Revista Agrotecnológica Amazónica*, 3(2), e555-e555.
<https://revistas.unsm.edu.pe/index.php/raa/article/view/555>
- 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://academic.oup.com/femsyr/article/9/5/774/531158?login=false>

- 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>
- De Vuyst, L., Camu, N., De Winter, T., Vandemeulebroecke, K., Van de Perre, V., Vancanneyt, M., ... & Cleenwerck, I. (2008). Validation of the (GTG) 5-rep-PCR fingerprinting technique for rapid classification and identification of acetic acid bacteria, with a focus on isolates from Ghanaian fermented cocoa beans. *International Journal of Food Microbiology*, 125(1), 79-90.
<https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2007.02.030>
- Díaz-Muñoz, C., & De Vuyst, L. (2021). Functional yeast starter cultures for cocoa fermentation. *Journal of Applied Microbiology*, 133(1), 39-66.
<https://doi.org/10.1111/jam.15312>
- 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, 616875.
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.616875>
- Díaz-Muñoz, C., Van de Voorde, D., Tuenter, E., Lemarcq, V., Van de Walle, D., Maio, J. P. S., ... & De Vuyst, L. (2023). An in-depth multiphasic analysis of the chocolate production chain, from bean to bar, demonstrates the superiority of *Saccharomyces cerevisiae* over *Hanseniaspora opuntiae* as functional starter culture during cocoa fermentation. *Food Microbiology*, 109, 104115.
<https://doi.org/10.1016/j.fm.2022.104115>
- Dulce, V. R., Anne, G., Manuel, K., Carlos, A. A., Jacobo, R. C., de Jesús, C. E. S., & 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>
- Fernández, R. D. R., Gallo, F. W. M., Cedeño, Á. M. G., Galeas, M. M. P., Quinteros, H. N. M., Ferrín, L. M. C., ... & 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. *Revista ciencia y tecnología*, 5(1), 7-12.
<https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=4149700>

- Figuroa-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, 41-50.
<https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2019.05.002>
- Gutiérrez-Ríos, H. G., Suárez-Quiroz, M. L., Hernández-Estrada, Z. J., Castellanos-Onorio, O. P., Alonso-Villegas, R., Rayas-Duarte, P., ... & González-Ríos, O. (2022). Yeasts as producers of flavor precursors during cocoa bean fermentation and their relevance as starter cultures: a review. *Fermentation*, 8(7), 331.
<https://doi.org/10.3390/fermentation8070331>
- 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>
- Koné, M. K., Guéhi, S. T., Durand, N., Ban-Koffi, L., Berthiot, L., Tachon, A. F., ... & 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>
- Kouame, L. M., Goualie, B. G., Adom, J. N., Koua, G., Ouattara, H. G., Doue, G., & Niamke, S. L. (2015). Diversity of microbial strains involved in cocoa fermentation from Sud-Comoé (Côte d'Ivoire) based on biochemical properties. *European Scientific Journal*, 11(18).
- Lefeber, T., Gobert, W., Vrancken, G., Camu, N., & De Vuyst, L. (2011). Dynamics and species diversity of communities of lactic acid bacteria and acetic acid bacteria during spontaneous cocoa bean fermentation in vessels. *Food microbiology*, 28(3), 457-464.
<https://doi.org/10.1016/j.fm.2010.10.010>
- Lefeber, 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, C. O. D. C., Vaz, A. B., De Castro, G. M., Lobo, F., Solar, R., Rodrigues, C., ... & Góes-Neto, A. (2021). Integrating microbial metagenomics and physicochemical parameters and a new perspective on starter culture for fine cocoa fermentation. *Food Microbiology*, 93, 103608.
<https://doi.org/10.1016/j.fm.2020.103608>
- Magagna, F., Guglielmetti, A., Liberto, E., Reichenbach, S. E., Allegrucci, E., Gobino, G., ... & Cordero, C. (2017). Comprehensive chemical fingerprinting of high-quality cocoa at early stages of processing: Effectiveness of combined untargeted and targeted approaches for classification and discrimination. *Journal of agricultural and food chemistry*, 65(30), 6329-6341.
<https://doi.org/10.1021/acs.jafc.7b02167>
- Magalhães da Veiga Moreira, I., de Figueiredo Vilela, L., da Cruz Pedroso Miguel, M. G., 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*, 22(5), 766.
<https://doi.org/10.3390/molecules22050766>
- Malo, P. M., & Urquhart, E. A. (2016). *Fermented foods: Use of starter cultures*. Elsevier.
- Martínez Ariza, S., & Sánchez Paniagua, M. *Evolución y avances en la selección de los cultivos iniciadores utilizados en la elaboración de productos lácteos*. Universidad Zaragoza.
<https://zaguan.unizar.es/record/63793>
- Meersman, E., Steensels, J., Struyf, N., Paulus, T., Saels, V., Mathawan, M., ... & 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>
- Mosquera, J. A. N., Escobar, K. Y. R., Morejon, J. P. A., & Llaguno, S. S. (2020). Métodos de fermentación del cacao nacional (*Theobroma cacao*) y su influencia en las características físico-químicas, contenido de cadmio y perfiles sensoriales. *Alternativas*, 21(3), 42-48.
<https://editorial.ucsg.edu.ec/alternativas/alternativas/article/view/339>
- Mota-Gutierrez, J., Botta, C., Ferrocino, I., Giordano, M., Bertolino, M., Dolci, P., ... & Cocolin, L. (2018). Dynamics and biodiversity of bacterial and yeast communities

- during fermentation of cocoa beans. *Applied and Environmental Microbiology*, 84(19), e01164-18.
<https://doi.org/10.1128/AEM.01164-18>
- Nisiotou, A., Gyftogianni, E., & Banilas, G. (2022). Evaluation of Different Molecular Markers for Genotyping Non-Saccharomyces Wine Yeast Species. *Microbiology Research*, 13(3), 643-654
<https://doi.org/10.3390/microbiolres13030046>
- Ordoñez-Araque, R. H., Landines-Vera, E. F., Urresto-Villegas, J. C., & Caicedo-Jaramillo, C. F. (2020). Microorganisms during cocoa fermentation: Systematic review.
<http://doi.org/10.21603/2308-4057-2020-1-155-162>
- 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>
- Peña González, M. A., Ortiz Urgiles, J. P., Santander Pérez, F. A., Lazo Vélez, M. A., & Caroca Cáceres, R. S. (2023). Physicochemical changes during controlled laboratory fermentation of cocoa (CCN-51) with the inclusion of fruits and on-farm inoculation. *Brazilian Journal of Food Technology*, 26, e2023013.
<https://doi.org/10.1590/1981-6723.01323>
- Rodríguez-Velázquez, N. D., Chávez-Ramírez, B., Gómez de la Cruz, I., Vásquez-Murrieta, M. S., & Estrada de los Santos, P. El cultivo del cacao, sus características y su asociación con microorganismos durante la fermentación. *Alianzas y Tendencias BUAP*. 2022; 7 (25): 36–51.
<http://repositorioslatinoamericanos.uchile.cl/handle/2250/3545629>
- Salazar, M. M. M., Alvarez, O. L. M., Castaneda, M. P. A., & Medina, P. X. L. (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>
- 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>
- Sipe, P. C., & Rodríguez, W. P. (2023). Proceso de fermentación del cacao (*Theobroma cacao* L.) en cajas de diversas especies maderables y en distintas épocas de cosechas producidas en Alto Beni. *CIBUM SCIENTIA*, 2(1), 66-76.
<https://doi.org/10.53287/gpig6349gj58o>
- Teneda Llerena, W. F. (2016). Mejoramiento del Proceso de Fermentación del Cacao. (*Theobroma cacao* L.) Variedad Nacional y Variedad CCN51.
<http://hdl.handle.net/10334/3743>
- 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. *Coffee and Cocoa Research Journal*, 36(3), 236-248.
<https://orcid.org/0000-0002-8479-2791>.
- Viesser, J. A., de Melo Pereira, G. V., de Carvalho Neto, D. P., Vandenberghe, L. P. D. S., Azevedo, V., Brenig, B., ... & 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>
- Vinicius De Melo Pereira, G., De Carvalho Neto, D. P., Junqueira, A. C. D. O., Karp, S. G., Letti, L. A., 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>
- Visintin, S., Alessandria, V., Valente, A., Dolci, P., & Cocolin, L. (2016). Molecular identification and physiological characterization of yeasts, lactic acid bacteria and acetic acid bacteria isolated from heap and box cocoa bean fermentations in West Africa. *International Journal of Food Microbiology*, 216, 69-78.
[10.1016/j.ijfoodmicro.2015.09.004](https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2015.09.004)
- Visintin, S., Ramos, L., Batista, N., Dolci, P., Schwan, F., & Cocolin, L. (2017). Impact of *Saccharomyces cerevisiae* and *Torulaspora delbrueckii* starter cultures on cocoa beans fermentation. *International Journal of Food Microbiology*, 257, 31-40.
<https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2017.06.004>

Wacher, M. (2011). Microorganismos y Chocolate. Digital Universitaria, 3.
<http://www.revista.unam.mx/vol.12/num4/art42/index.html>

ANEXOS

Anexo 1 – Medios formulados para la generación de Biomasa

• BAL

| MRS | |
|----------------------|---------|
| dextrosa | 20g/l |
| fosfato dipotasico | 2g/L |
| extracto de carne | 4g/L |
| sulfato de magnesio | 0,2g/L |
| sulfato de manganeso | 0,04g/L |
| tween 80 | 1ml/L |
| extracto de levadura | 4g/L |
| acetato de sodio | 5g/L |
| citrato de amonio | 2g/L |
| peptona | 10g/L |

| MRS modificado | |
|-----------------------|---------|
| glucosa | 20g/L |
| fosfato dipotasico | 2g/L |
| extracto de carne | 4g/L |
| sulfato de magnesio | 0,2g/L |
| sulfato de manganeso | 0,04g/L |
| tween 80 | 1ml/L |
| extracto de levadura | 4g/L |
| acetato de sodio | 5g/L |
| citrato de amonio | 2g/L |
| peptona | 20g/L |

• BAA

| YGM | |
|----------------------------|-------|
| glucosa | 20g/L |
| manitol | 20g/L |
| extracto de levadura | 10g/L |
| fosfato diacido de potasio | 1g/L |
| cittrato de sodio 1g/L | 1g/L |
| acido lactico | 10g/L |
| peptona | 5g/L |
| sulfato de magnesio | 1g/L |
| fosfato de diamonio | 1g/L |
| tween 80 | 1ml/L |

| GYC | |
|----------------------|-------|
| agar | 20g/L |
| carbonato de calcio | 5g/L |
| dextrosa | 50g/l |
| extracto de levadura | 10g/L |

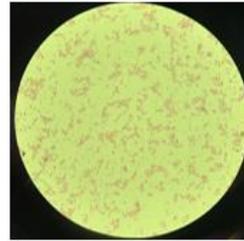
• Levaduras

| YPG modificado | |
|-----------------------|-------|
| glucosa | 2% |
| extracto de levadura | 0,50% |
| peptona | 1% |

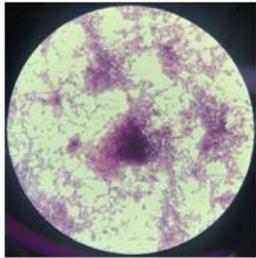
| PDB | |
|-------------------|--------|
| dextrosa | 20g/L |
| infusion de papas | 6.5g/L |

| YPG | |
|----------------------|----|
| glucosa | 2% |
| peptona | 2% |
| extracto de levadura | 1% |
| agar | 2% |

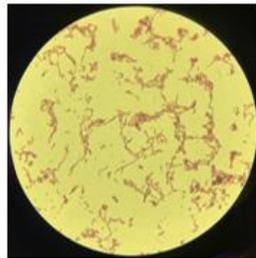
Anexo 2 – Tinciones del medio GYC de CI



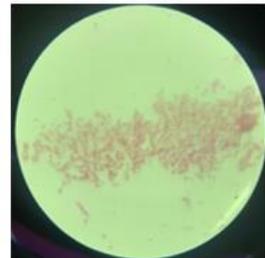
+
(A. ghanensis)



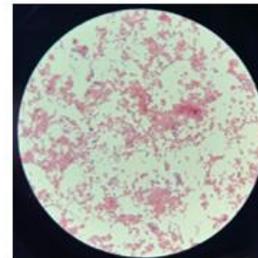
Día 0



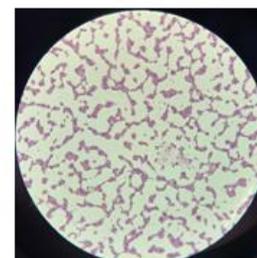
Día 1



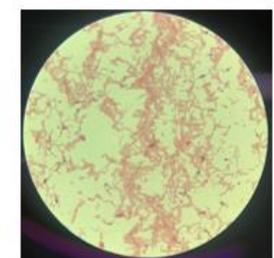
Día 2



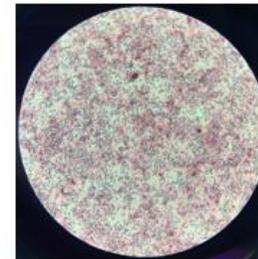
Día 3 - C. Blanca



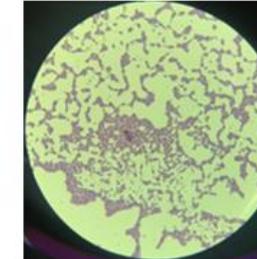
Día 4 - C. Blanca



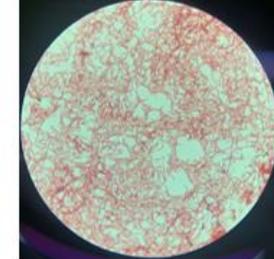
Día 7- C. Pequeña



Día 3 - C. Amarilla

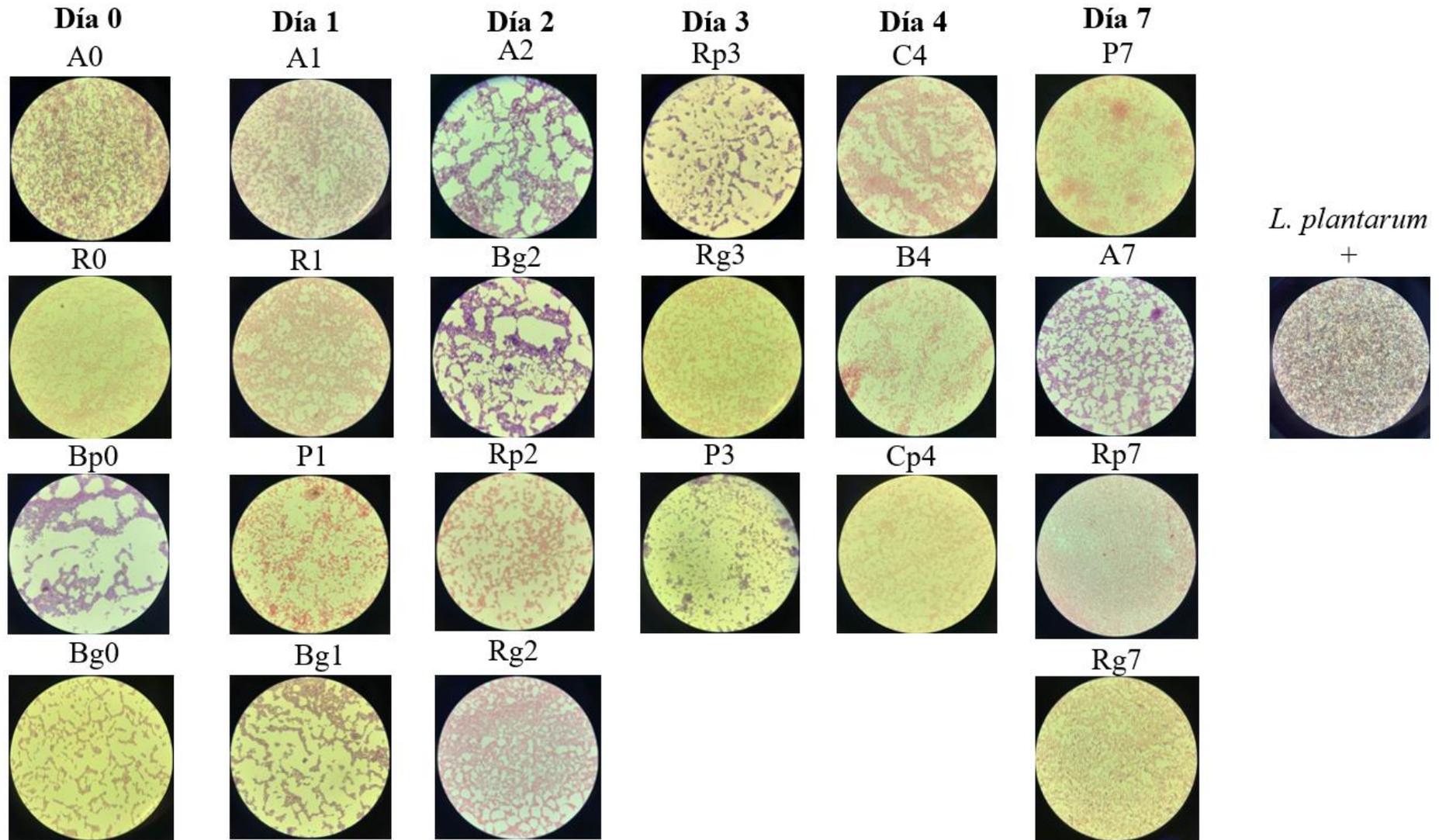


Día 4 - C. Amarilla



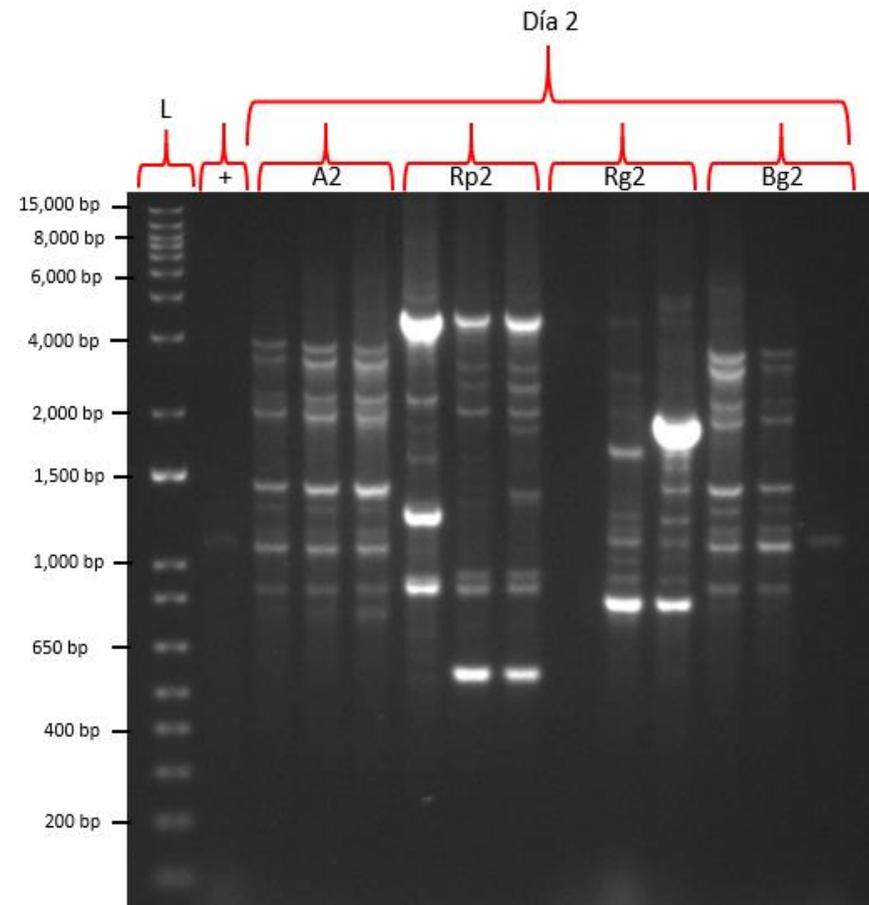
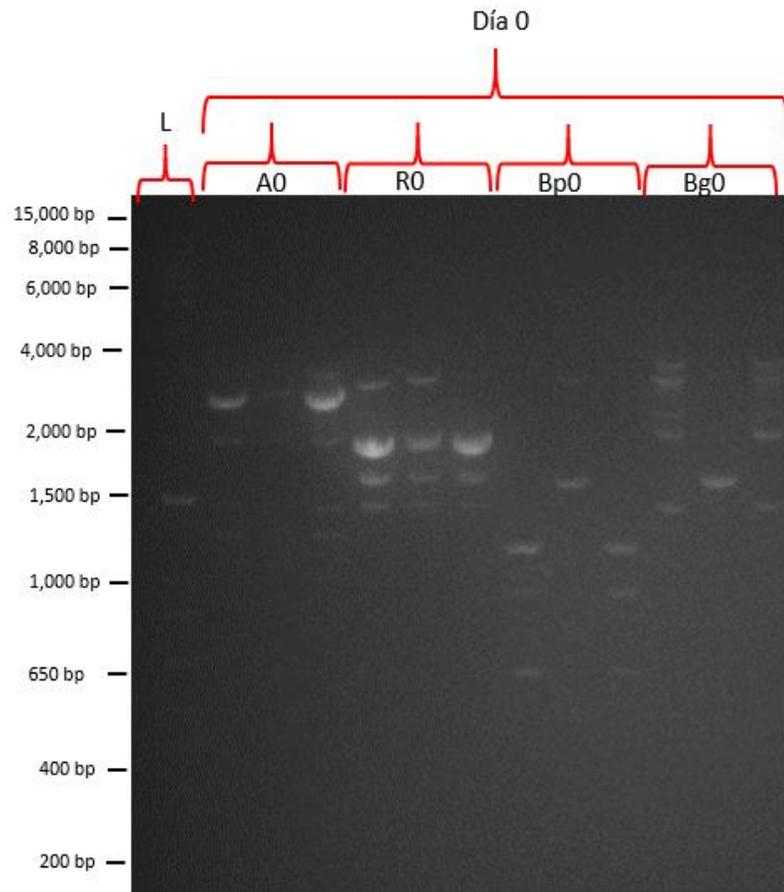
Día 7- C. Grande

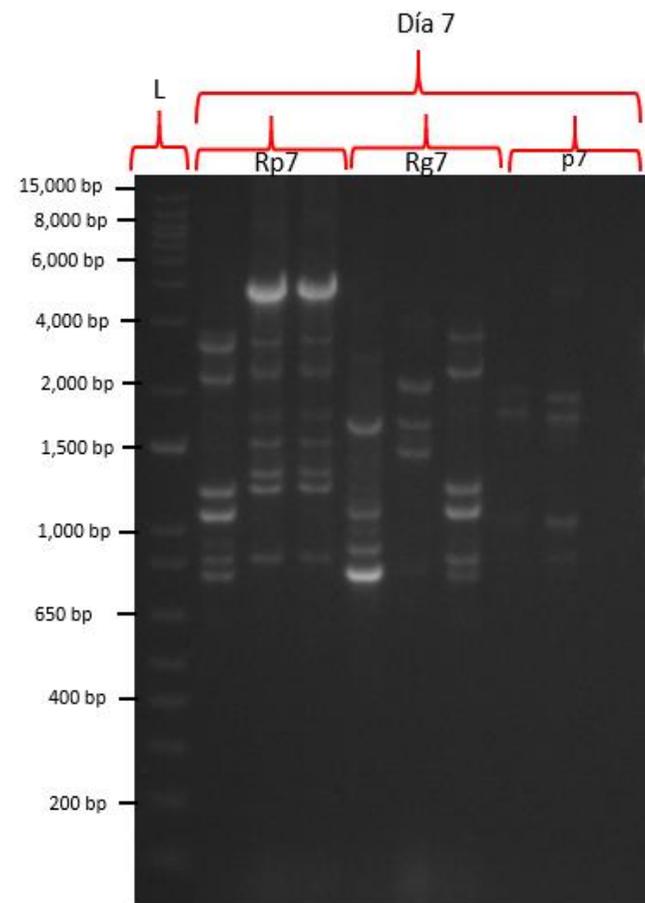
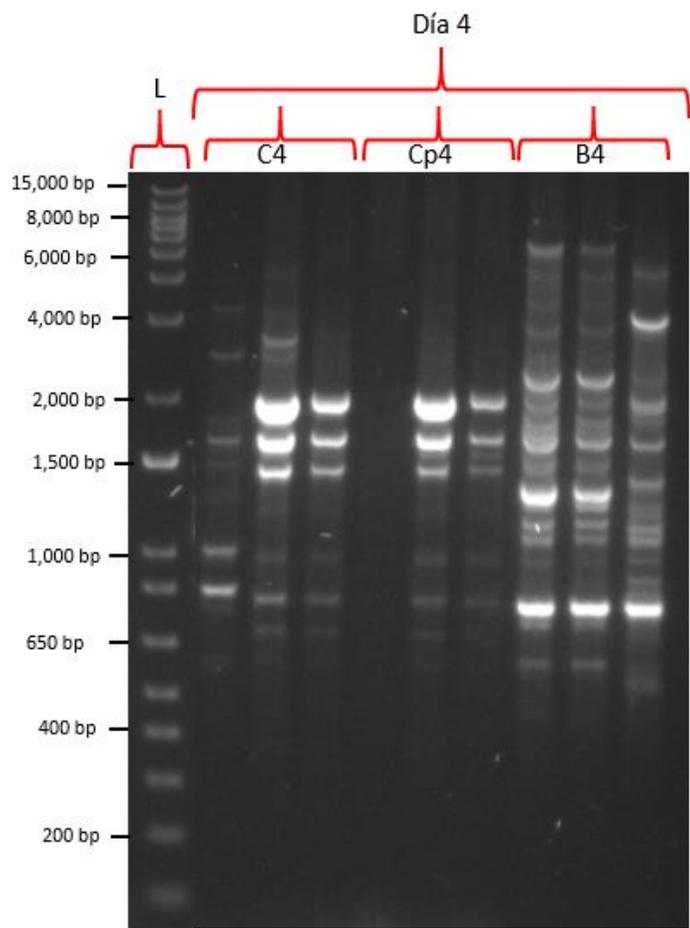
Anexo 3 – Tinciones de medio MRS del CI



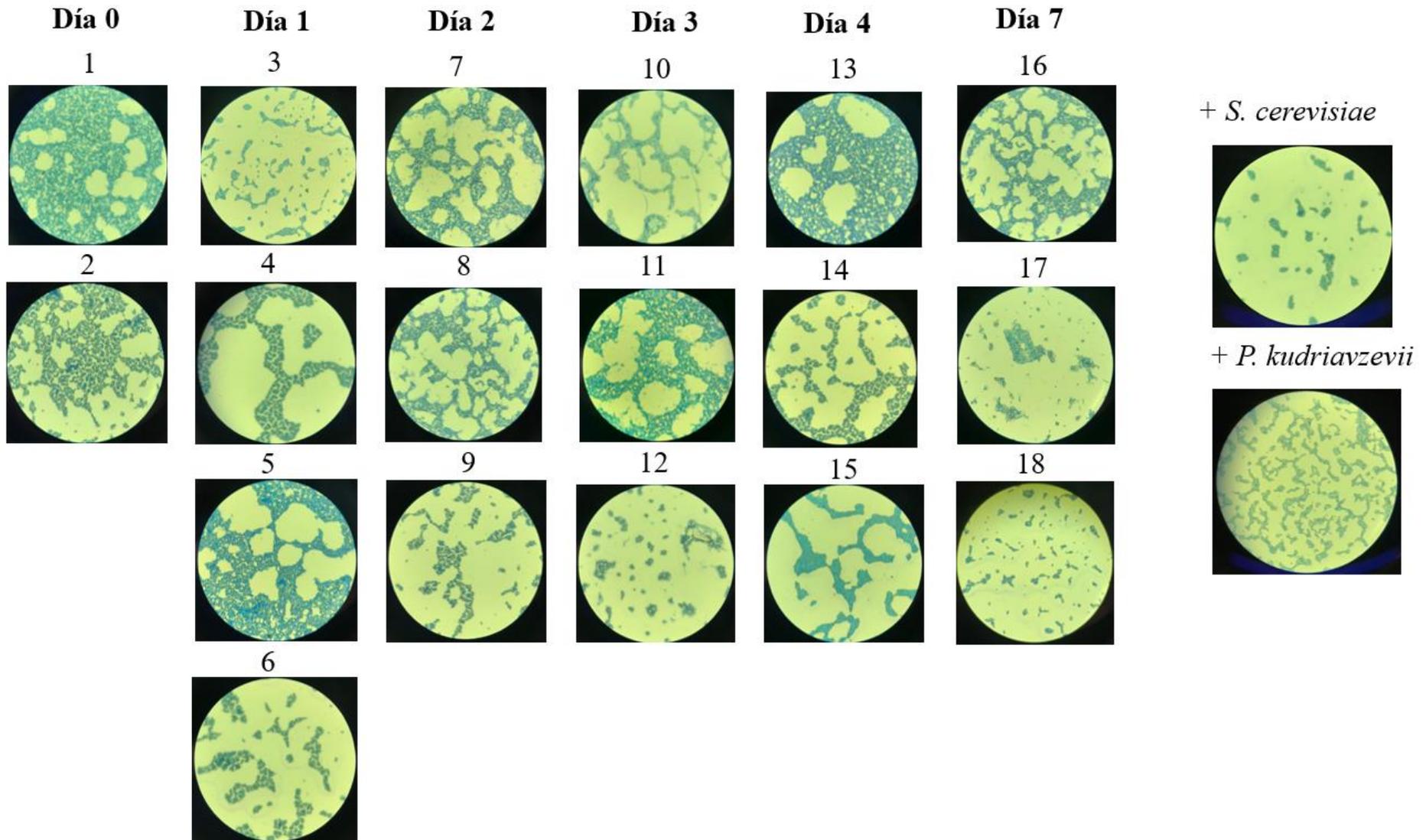
Anexo 4 – Geles de electroforesis de colonias presentes en medio MRS

L, Ladder TrackIt™ 1 Kb Plus; +, *L. plantarum*





Anexo 5 – Tinciones del medio PDA de CI



Anexo 6 – Tinciones del medio PDA de FE

