



**UNIVERSIDAD
DEL AZUAY**

FACULTAD DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA

ESCUELA DE INGENIERÍA EN ALIMENTOS

Aplicación de una inoculación secuencial de microorganismos para una
fermentación de cacao CCN-51 con adición de pulpa de frutas

Trabajo previo a la obtención del grado académico de:

Ingeniero en Alimentos

Autores:

Daniela Alexandra Alvarado Ulloa

Pablo Andrés Izquierdo Acosta

Director:

Mgst. María Alicia Peña González

Cuenca-Ecuador

2026

Dedicatoria

“Con todo mi amor y gratitud, dedico esta tesis a mis padres, Carmen y Yury, por su cariño y apoyo incondicional; por las madrugadas que no los dejé dormir y por los fines de semana que no compartí por hacer tareas. Este logro se lo debo a ustedes, que estuvieron en cada paso que di, alentándome a seguir adelante y dar siempre lo mejor de mí.

A mi abuelita Michi y a mi abuelito Carlos, quienes desde el cielo sé que siempre me cuidan y guían mi caminar. Cada logro y meta alcanzada se los dedico a ustedes.

A mis hermanos y a mi abuelita, Xavier, Belén y Carmen, por sus consejos, su apoyo y sus palabras de aliento, incluso cuando no entendían del todo mi carrera.

Y a mi novio, Pablo, por haber sido mi compañero en esta travesía; por las noches en vela estudiando, por las veces en que el estrés me superaba y lograbas calmarme con un abrazo, y por siempre sacar la mejor versión del otro.”

Daniela Alvarado

“A mis padres, Paúl y Cecilia, por ser el pilar inamovible de mi vida. Por tener la sensibilidad de escuchar mis silencios y abrazar mis angustias, incluso sin conocer el origen de mi pesar. Por su sacrificio silencioso de tiempo y salud que se convirtió en la base moral de mi formación; este título es el fruto de su esfuerzo incansable. A ambos, gracias por amarme más allá de mis aciertos y por ser la razón principal de mi perseverancia.

A mis hermanos, Nicolás y María Paula, por caminar a mi lado con una lealtad incondicional, convirtiéndose en mis guías y en el recordatorio constante de que nunca estuve solo en esta travesía. Me enseñaron junto a mis padres que nada es imposible, si remamos juntos como un solo puño.

A mi abuela materna, por ser la raíz de mi determinación y la persona que, con su fe inquebrantable, me permitió sembrar la primera semilla de este camino que hoy llega a su cosecha.

A mi abuela y bisabuela, quienes donde se encuentren custodian mis pasos y continúan celebrando cada uno de mis éxitos con el mismo orgullo de siempre. Sé que hoy sonríen desde el cielo, presumiendo este logro como si fuera propio.

A mi pareja, Daniela, por ser parte de este logro y mi refugio incondicional durante nuestra carrera universitaria. Gracias por ser mi escape, mi camino de vuelta a lo que importa y por caminar de la mano conmigo en este sendero.

A mi familia y amigos, quienes mediante risas compartidas, conversaciones profundas y consejos oportunos en los momentos de crisis, lograron que el peso de este camino fuera ligero.”

Pablo Izquierdo

Agradecimientos

En primer lugar, deseamos expresar nuestro más sincero agradecimiento a la Mgst. María Alicia Peña González y al Dr. Rodrigo Caroca Cáceres, por su disposición, paciencia y por compartir con nosotros sus conocimientos durante el desarrollo de esta investigación.

A los laboratoristas de la universidad, por su apoyo, guía y disposición para la realización de este proyecto. A nuestros compañeros de la carrera, por cada momento compartido y por hacer de este camino una experiencia más grata.

A nuestras familias, por haberse convertido en una sola red de apoyo a lo largo de este camino. Gracias por entender nuestras ausencias, por respetar nuestros silencios y por brindarnos el aliento necesario cuando el cansancio parecía ganarnos la batalla.

Finalmente, queremos agradecer a la Universidad del Azuay, por brindarnos el espacio y los recursos necesarios para nuestra formación personal y profesional.

A todos ustedes, nuestra más profunda gratitud.

Resumen

En Ecuador, el cacao CCN-51 es reconocido por su alta productividad y resistencia; sin embargo, presenta una calidad sensorial inferior al cacao Fino de Aroma, lo que limita su competitividad en mercados especializados. En este contexto, el presente estudio evaluó el efecto de una inoculación secuencial de microorganismos en una fermentación de cacao CCN-51 con adición de pulpa de frutas. Se aplicaron cinco tratamientos experimentales utilizando cultivos iniciadores de levaduras, bacterias ácido lácticas (BAL) y bacterias ácido acéticas (BAA). Durante la fermentación se monitorearon pH y temperatura, se realizó un análisis metagenómico de la dinámica microbiana y se evaluó la calidad de los granos mediante prueba de corte e índice de fermentación. Los resultados evidenciaron que la inoculación secuencial y la sustitución parcial del mucílago por pulpas de frutas modificaron la sucesión microbiana característica de la fermentación del cacao. El análisis metagenómico mostró una alta abundancia de levaduras en los tratamientos inoculados, lo que posiblemente limitó el desarrollo esperado de BAL y BAA. Asimismo, estos tratamientos presentaron un incremento térmico acelerado durante las primeras 24 h de fermentación. En todos los tratamientos se observó una disminución gradual del pH; sin embargo, únicamente el control sin reemplazo de pulpas presentó una reducción significativa a las 120 h. Entre los tratamientos con CI, la inoculación con levaduras y BAL al inicio, seguida de BAA a las 48 h, alcanzó el mayor porcentaje de granos bien fermentados (41%).

Palabras clave: Cacao CCN-51, fermentación de cacao, inoculación secuencial, pulpa de frutas, *Lactiplantibacillus plantarum*, *Acetobacter ghanensis*, metagenómica.

Abstract

In Ecuador, CCN-51 cocoa is recognized for its high productivity and resistance; however, it exhibits lower sensory quality than Fine Aroma cocoa, thereby limiting its competitiveness in specialized markets. Within this context, the present study evaluated the effect of sequential microbial inoculation during the fermentation of CCN-51 cocoa supplemented with fruit pulp. Five experimental treatments were applied using starter cultures of yeasts, lactic acid bacteria (LAB), and acetic acid bacteria (AAB). Throughout the fermentation process, pH and temperature were monitored, a metagenomic analysis of microbial dynamics was conducted, and bean quality was assessed through cut tests and fermentation index determination. The results demonstrated that sequential inoculation and the partial replacement of mucilage with fruit pulps altered the characteristic microbial succession of cocoa fermentation. Furthermore, metagenomic analysis revealed a high abundance of yeasts in the inoculated treatments, which possibly limited the expected development of LAB and AAB. Moreover, these treatments exhibited an accelerated temperature increase during the first 24 h of fermentation. A gradual decrease in pH was observed in all treatments; nevertheless, only the control treatment without pulp replacement showed a significant reduction at 120 h. Among the treatments with starter cultures, inoculation with yeasts and LAB at the beginning of fermentation, followed by AAB at 48 h, achieved the highest percentage of well-fermented beans (41%).

Keywords: CCN-51 cocoa, cocoa fermentation, sequential inoculation, fruit pulp, *Lactiplantibacillus plantarum*, *Acetobacter ghanensis*, metagenomics.

Índice de contenidos

Introducción	1
1 Marco Teórico	3
1.1 Contextualización del cacao en Ecuador.....	3
1.2 Procesos poscosecha	4
1.3 Fermentación de cacao	5
1.3.1 Levaduras.....	5
1.3.2 Bacterias ácido lácticas (BAL)	6
1.3.3 Bacterias ácido acéticas (BAA)	7
1.4 Uso de cultivos iniciadores en la fermentación de cacao.....	7
2 Metodología.....	10
2.1 Reactivación de microorganismos seleccionados	10
2.2 Determinación de curvas de crecimiento microbiano	11
2.3 Preparación de los cultivos iniciadores	12
2.4 Fermentación de cacao con adición secuencial de mezclas de microorganismos.....	13
2.5 Determinación de Temperatura y pH.....	14
2.6 Índice de fermentación (IF).....	14
2.7 Prueba de corte de los granos fermentados	14
2.8 Análisis metagenómico	15
3 Resultados y Discusión.....	16
3.1 Análisis de crecimiento de cultivos iniciadores	16
3.1.1 Curvas de crecimiento microbiano	16
3.2 Fermentación secuencial de cacao	18
3.2.1 Análisis de temperatura y pH.....	18
3.2.2 Diversidad microbiana	21
3.3 Determinación de índice de fermentación.....	25

3.4	Prueba de corte	27
4	Conclusiones	29
5	Recomendaciones	30
6	Referencias.....	31
7	Anexos	36

Índice de tablas

Tabla 1. Estudios sobre identificación de cultivos iniciadores	8
Tabla 2. Estudios sobre aplicación de inoculación secuencial en la fermentación de cacao	9
Tabla 3. Medio y condiciones de cultivo para los microorganismos	10
Tabla 4. Condiciones de cultivo y parámetros de monitoreo para la evaluación cinética de <i>Lactiplantibacillus plantarum</i> y <i>Acetobacter ghanensis</i>	12
Tabla 5. Protocolo experimental para los cinco tratamientos	13

Índice de figuras, gráficas y/o imágenes

Figura 1. Cinética de crecimiento <i>Acetobacter ghanensis</i> ..	16
Figura 2. Cinética de crecimiento <i>Lactiplantibacillus plantarum</i> .	17
Figura 3. Dinámica de temperatura durante el proceso de fermentación	19
Figura 4. Dinámica de pH externo durante el proceso de fermentación..	20
Figura 5. Dinámica de pH interno durante el proceso de fermentación.	21
Figura 6. Gráfica de análisis metagenómico para tratamientos espontáneos.	22
Figura 7. Gráfica de análisis metagenómico para tratamientos inoculados.	24
Figura 8. Índice de fermentación.	25
Figura 9. Gráfica de porcentaje de fermentación del cacao según la prueba de corte.	28

Índice de anexos

Anexo A. Concentración de los cultivos iniciadores empleados en la fermentación	36
Anexo B. Fotografías del proceso fermentativo	37
Anexo C. Análisis de prueba de corte	39
Anexo D. Resultados de la fermentación según la prueba de corte	39
Anexo E. Índice de fermentación	40

Introducción

Ecuador es uno de los principales exportadores de cacao a nivel mundial, cuyo producto es apreciado por su calidad sensorial. Según datos recientes de la Organización Internacional del Cacao (2025), Ecuador es el país latinoamericano con mayor producción alcanzando las 480 mil toneladas al año entre 2024 y 2025, lo que lo posiciona como el tercer mayor productor a nivel mundial, después de Costa de Marfil y Ghana. En este territorio se producen principalmente dos variedades de cacao: Fino de Aroma y CCN-51. La variedad Fino de Aroma, también conocida como “Nacional” o “Arriba”, es de gran demanda, ya que se utiliza para producir chocolates de la más alta calidad. Por otro lado, la variedad CCN-51 se considera un cacao granel que se utiliza para producir chocolates de menor calidad; e incluso, cacao en polvo (Salinas et al., 2016).

En este contexto, según datos del MAGAP (actualmente MAG-Ministerio de Agricultura y Ganadería), en el año 2011, el 80% de las superficies sembradas correspondían a la variedad de cacao Fino de Aroma y el 20% restante CCN-51. Sin embargo, debido a la productividad y resistencia de esta última variedad, CCN-51 se está propagando y se estima que, en los últimos 20 años, el 90% de la superficie renovada corresponde a este cultivar (Vicepresidencia del Ecuador, 2015).

Así, variedades con características sensoriales inferiores cobran relevancia en el esquema agrícola y, por tanto, económico del país. Cabe mencionar que los procesos y tratamientos poscosecha del grano de cacao también constituyen una alternativa para mejorar la calidad del producto final. En este sentido, las características de sabor y aroma del cacao se desarrollan fundamentalmente durante la fermentación; sin embargo, es en esta fase donde existe un menor control del proceso (Ozturk & Young, 2017). Según Streule et al. (2023), en Ecuador, alrededor del 84% de los productores de cacao operan en fincas de pequeño tamaño y el 16% restante en fincas de mediano y grande tamaño. Dichas cifras son relevantes debido a que en fincas de tamaño pequeño a menudo las prácticas agrícolas y procesos poscosecha se realizan con los conocimientos transmitidos de generación en generación. Esto da como resultado procesos mal controlados y heterogéneos que afectan la calidad y el sabor de los granos de cacao fermentados y, posteriormente, del chocolate elaborado con esta materia prima. Según estudios de Papalexandratou et al. (2011), donde se evaluaron los métodos tradicionales de fermentación en Ecuador, se señala que estos suelen ser de corta duración (alrededor de 3 a 4 días) y no

siempre se realizan bajo condiciones controladas, lo cual impide una completa oxidación del etanol a ácido acético, afectando negativamente la calidad del grano.

En este marco, resulta necesario plantear estrategias que permitan estandarizar y optimizar la fermentación del cacao, en particular la del CCN-51, cuya expansión es evidente en el país, pero cuyo potencial sensorial aún se encuentra limitado. La implementación de técnicas controladas, como la inoculación secuencial de microorganismos y la incorporación de pulpa de frutas, representa una alternativa innovadora para mejorar las propiedades organolépticas de este cultivar, contribuyendo no sólo al incremento de su competitividad en mercados especializados, sino también al fortalecimiento de la cadena productiva nacional del cacao.

CAPÍTULO 1

1 Marco Teórico

1.1 Contextualización del cacao en Ecuador

Actualmente, la producción de cacao se ha convertido en una de las actividades agrícolas de mayor relevancia a nivel mundial, no solo por su valor económico sino también por su influencia cultural y gastronómica. Los granos de cacao se obtienen del fruto del árbol *Theobroma cacao*, que se cultiva principalmente en regiones ecuatoriales, donde las condiciones de temperatura, humedad y precipitación favorecen su desarrollo. Entre las principales zonas productoras de cacao destacan Costa de Marfil y Ghana (en África occidental), Indonesia y América del Sur, siendo Ecuador y Brasil las más representativas (Putri et al., 2024).

La calidad del grano de cacao está directamente influenciada por su genotipo y origen geográfico. Existen tres grupos genéticos principales a nivel mundial: Forastero, Criollo y Trinitario; sin embargo, Ecuador es el hogar de una cuarta variedad llamada Nacional, o Fino de Aroma (Kongor et al., 2016), altamente reconocida y demandada por las industrias a nivel internacional. Esta variedad, aunque genéticamente similar al Criollo, destaca por su pureza y perfil sensorial exquisito, acompañado de notas florales, frutales y especiadas (Constante et al., 2024). El predominio del cacao Fino de Aroma en Ecuador, mantenido hasta principios del siglo XX, experimentó un drástico declive en la década de 1930. La principal causa de esta caída en la producción fue la propagación de enfermedades fitopatógenas devastadoras, como “la escoba de bruja” (*Moniliophthora perniciosa*), “la monilla” (*Moniliophthora roreri*) y el “mal de machete” (*Ceratocystis fimbriata*) (Boza et al., 2014). Frente a esta crisis, hacia 1950 se iniciaron ensayos de mejoramiento genético que buscaban recuperar la productividad y la estabilidad del cacao ecuatoriano, lo que dio como resultado el clon CCN-51 (Colección Castro Naranjal), ampliamente reconocido por su alta productividad, resistencia a plagas y adaptabilidad a diversos climas (Jaimez et al., 2022).

Sin embargo, CCN-51 no destaca por su perfil sensorial. El licor obtenido de esta variedad se caracteriza por poseer notas amargas y carecer de sabores especiales, por lo que se considera un cacao a granel que necesita mezclarse con licores de mejor calidad para la elaboración de chocolates (Flórez-Quintana et al., 2015). Esto se debe a que, a diferencia del cacao Fino de Aroma, el mucílago en las mazorcas de CCN-51 es menos dulce, lo que reduce la cantidad de

azúcares disponibles para el proceso fermentativo (Salinas et al., 2016). Adicionalmente, según análisis químicos de este cacao, se registran concentraciones bajas o nulas de compuestos asociados a notas florales y frutales, como el linalol y el acetato isoamílico, pero con una mayor concentración de compuestos responsables del sabor a chocolate en comparación con la otra variedad ecuatoriana (Kadow et al., 2013).

1.2 Procesos poscosecha

Los procesos poscosecha del cacao constituyen una serie de etapas clave que transforman las semillas frescas en granos aptos para su uso como materia prima para la elaboración de chocolates. Si bien se destacan los procesos de fermentación y secado como responsables de la calidad del cacao (Kotey et al., 2022), es importante reconocer el rol de todas y cada una de las etapas en su obtención y procesamiento. Para la cosecha de las mazorcas se analizan varios aspectos como la madurez adecuada, la ausencia de insectos, enfermedades y/o daños mecánicos (Quiroz, 2012). Al momento de cosechar es crucial identificar los frutos que se encuentren en su punto óptimo de maduración. Los frutos inmaduros no cuentan con la cantidad necesaria de azúcares en la pulpa, lo que dará como resultado una fermentación ineficiente, mientras que, si las semillas se encuentran a punto de germinar, en la fermentación se desarrollarán sabores desagradables (Cerón et al., 2020).

Como siguiente etapa, varios autores han descrito la influencia positiva del almacenamiento de las mazorcas, empleando este proceso como un preacondicionamiento de la pulpa. Según Afokawa et al. (2012), dicho proceso provoca una disminución en el volumen de la pulpa debido a procesos de evaporación y acción de las pectinasas lo que, junto con la inversión de la sacarosa, disminuye la producción de ácido durante la fermentación, evitando que el pH descienda más de 4,5 y mejorando el equilibrio ácido. Nazaueuddin et al. (2006) reportaron que un almacenamiento de las mazorcas de hasta 15 días tiene un efecto significativo en la reducción de la acidez, de los contenidos de polifenoles y del índice de fermentación en el cacao híbrido de Malasia.

Una vez abiertas las mazorcas se realiza una selección de los granos, descartando aquellos frutos enfermos, verdes, sobremaduros e incluso partidos o germinados, para así alcanzar una fermentación uniforme. Según el método de fermentación a utilizar, se depositan los granos con mucílago en cajas de madera o plástico, sacos de fique o yute, en arrumes y/o con hojas de

banano (Cerón et al., 2020), y son fermentados durante aproximadamente 6 días. Por último, los granos fermentados se someten a un proceso de secado para lograr reducir el contenido de humedad a un nivel óptimo de alrededor de 7-7,5%, evitando la sobrefermentación y contaminación por moho (Kotey et al., 2022). Adicionalmente, durante el secado continúan dándose algunas reacciones enzimáticas menores que afinan el perfil de sabor y aroma del cacao e inclusive otorgan el característico color marrón oscuro del grano (Afokawa et al., 2012).

1.3 Fermentación de cacao

La fermentación de cacao comprende una dinámica entre distintos grupos microbianos: levaduras, bacterias ácido lácticas y bacterias ácido acéticas. Dos etapas tienen lugar en este proceso; inicialmente, una fase anaeróbica dominada por levaduras que convierten los azúcares de la pulpa en etanol, junto con la participación de bacterias ácido lácticas (BAL), que transforman los azúcares en ácido láctico (Campos et al. 2025). A medida que la masa fermentada se airea por el volteo y aumentan la temperatura y el pH, se establece una segunda fase aeróbica donde las bacterias ácido acéticas (BAA) proliferan (Lopes et al., 2024). Las BAA oxidan el etanol a ácido acético, lo que, junto al incremento de temperatura, provoca la muerte del embrión y desencadena la formación de precursores de sabor (Mota-Gutiérrez et al., 2018). Adicionalmente, tras la muerte del grano, se liberan enzimas oxidativas, como las polifenoloxidasas, que degradan los compuestos fenólicos y son responsables del cambio de color de púrpura a marrón. A medida que estos compuestos se oxidan y polimerizan, el cambio de color se vuelve más uniforme, garantizando que se ha llevado a cabo correctamente la fermentación (Ruiz-Santiago et al., 2024).

1.3.1 Levaduras

Las levaduras inician la fermentación y predominan durante las primeras 24-48 horas. Estudios han demostrado que estos microorganismos cumplen varios roles fundamentales en la fermentación, tales como la producción de etanol, ácidos orgánicos (ej. ácido oxálico, fosfórico, succínico, málico y acético) y compuestos aromáticos que contribuyen positivamente al perfil aromático del chocolate (Schwan, 1998). Además, estos microorganismos son responsables de reducir la viscosidad de la pulpa, gracias a la actividad pectinolítica que poseen ciertas especies de levaduras (Díaz-Muñoz & De Vuyst, 2021).

Comúnmente, en las fermentaciones de cacao, se han reportado como levaduras frecuentes a *Saccharomyces cerevisiae*, *Hanseniaspora uvarum*, *Candida tropicalis* y algunas especies del género *Pichia* (Morales-Rodríguez et al., 2024). Es importante destacar que la aparición y crecimiento de estas especies dependerá de los métodos postcosecha, superficies de contacto y nivel de maduración de los granos. Al iniciarse la fermentación, géneros como *Hanseniaspora* dominan el medio debido a su tolerancia a la acidez y a su rápido crecimiento. Sin embargo, su abundancia disminuye a medida que la temperatura y concentración de etanol aumentan, por lo que son reemplazadas por levaduras más resistentes como *Saccharomyces* o *Pichia* (Díaz-Muñoz & De Vuyst, 2021).

1.3.2 Bacterias ácido lácticas (BAL)

Aproximadamente tras 24 a 72 h de fermentación, como efecto del drenaje de pulpa, el aire se filtra en la masa fermentativa, lo que da inicio a la transición de la fase anaeróbica a la fase aerobia. De esta forma, el medio adquiere las características para el desarrollo de bacterias ácido lácticas (De Vuyst & Weckx, 2016). Las BAL son clave en la fermentación del cacao, ya que, como función principal, tienen la producción de ácido láctico y con ello el descenso del pH para inhibir el crecimiento de microorganismos no deseados. Si bien este es el principal metabolito generado en esta fase, también se producen compuestos secundarios como otros ácidos orgánicos, sustancias de bajo peso molecular y bacteriocinas (Campos et al., 2015). Además, entre otras de sus funciones, y dependiendo de si la especie es homo o heterofermentativa, consumen ácido cítrico y convierten la fructosa de la pulpa en manitol, contribuyendo de manera significativa al perfil de sabor final del grano, aportando notas dulces y frescas (De Vuyst & Leroy, 2020).

En fermentaciones tradicionales, se distinguen dos etapas de intervención para las bacterias ácido lácticas; la primera de ellas ocurre simultáneamente con el crecimiento de levaduras, donde *Fructobacillus pseudoficulneus*, *F. tropeaoli* y *Leuconostoc pseudomesenteroides* por su facilidad para usar fructosa como fuente de energía, no tienen interacciones competitivas con las levaduras. Contribuyen al aumento de pH con la producción de ácido láctico, ácido acético y consumo de ácido cítrico. (De Vuyst & Leroy, 2020). A mitad de la fermentación, únicamente bacterias heterofermentativas predominan en el proceso, es así que se ha reportado que, *Lactiplantibacillus plantarum* y *Limosilactobacillus fermentum* son las especies de BAL más predominantes en fermentaciones de granos de cacao realizadas en Ghana (Camu et al.,

2007). Además, los autores reportaron que *L. plantarum* disminuye y *L. fermentum* aumenta con el tiempo de fermentación, siendo esta última la que a menudo domina el proceso.

1.3.3 Bacterias ácido acéticas (BAA)

El crecimiento de bacterias ácido acéticas ocurre aproximadamente después de las 72 h de fermentación. Según De Vuyst & Weckx (2016), el ácido acético producido por estas bacterias se difunde en el cotiledón, lo que junto con el etanol y el aumento de temperatura causa la muerte del embrión del grano. Las estructuras de almacenamiento de las células se rompen, liberando polifenoles y proteínas, que conducen a reacciones bioquímicas para precursores de sabor y aroma, así como al color del grano. Las antocianinas son pigmentos responsables de la coloración púrpura en el interior del grano de cacao. Enzimas glucosidasas rompen los enlaces glucósidos de estas moléculas, transformándolas en antocianidinas que finalmente se oxidan en quinonas responsables del color marrón (Ruiz-Santiago, 2024). Los géneros de bacterias ácido acéticas recurrentes en fermentaciones de cacao son *Acetobacter* y *Gluconobacter* con especies como *A. lovaniensis*, *A. syzygii*, *A. tropicalis*, *A. pasteurianus*, *A. aceti*, *A. tropicalis* y *G. oxydans* cuyo predominio depende del origen geográfico de la fermentación (Lopes et al., 2024).

1.4 Uso de cultivos iniciadores en la fermentación de cacao

Las fermentaciones de cacao se llevan a cabo mayoritariamente en las propias fincas donde se cosechan los frutos, lo que aumenta la variabilidad de los resultados debido al carácter espontáneo del proceso. Esta falta de control se traduce en defectos sensoriales, como excesiva acidez o ausencia del sabor característico, causados por fermentaciones incompletas, o la aparición de notas indeseables por sobrefermentación o deterioro microbiano (Schwan, 1998). Varios de estos defectos se han observado en la producción de cacao ecuatoriano, lo que repercute en su valor en los mercados internacionales. Por ello, surge la necesidad de controlar adecuadamente este proceso para mejorar la calidad y la productividad del sector cacaotero en el país (Papalexandratou et al., 2011).

En busca de estandarizar y optimizar la calidad de los granos de cacao fermentados, nuevas tendencias, como el uso de “cócteles microbianos” determinados y de protocolos secuenciales de inoculación, han cobrado relevancia. El uso de consorcios microbianos potencia la síntesis

de compuestos aromáticos, reduce el tiempo y mejora el control del proceso fermentativo (Balcázar-Zumaeta et al., 2023).

Uno de los factores clave en el desarrollo de cultivos iniciadores es la identificación de microorganismos con un potencial metabólico adecuado, capaces de contribuir de manera efectiva a la generación de metabolitos deseables durante el proceso fermentativo. En la Tabla 1, se presenta una síntesis de varios estudios en los que se han evaluado estos microorganismos potenciales.

Tabla 1. Estudios sobre identificación de cultivos iniciadores

Título	Criterio de selección	Hallazgo	Referencia
Assessment of the contribution of cocoa-derived strains of <i>Acetobacter ghanensis</i> and <i>Acetobacter senegalensis</i> to the cocoa bean fermentation process through a genomic approach.	Análisis genómico de la respuesta al estrés ácido y capacidades metabólicas.	El análisis genómico de <i>Acetobacter ghanensis</i> revela que posee una ventaja energética única y está adaptada para consumir citrato, aunque su menor tolerancia al ácido limita su competitividad.	Illegheems et al. (2016)
Selección de levaduras promisorias para el desarrollo de un cultivo iniciador promotor de la fermentación del cacao. Ingeniería y Competitividad	Termotolerancia, Tolerancia a Etanol, Tolerancia a Ácido Acético, Tolerancia a pH Ácido, Actividad enzimática.	Basándose en una combinación de alta tolerancia al estrés y, crucialmente, una alta actividad proteolítica y pectinolítica, el estudio identificó a las levaduras <i>Wickerhamomyces anomalus</i> y <i>Pichia kudriavzevii</i> como las candidatas más prometedoras para ser incluidas en un cultivo iniciador funcional.	Criollo Nuñez et al. (2024)
Selection Of Lactic Acid Bacteria as Starter Culture for Cocoa Fermentation (<i>Theobroma Cacao L.</i>)	Tolerancia al estrés y actividad antifúngica.	La actividad antifúngica es decisiva. Se seleccionó <i>Lactiplantibacillus plantarum</i> H 2.34 como iniciador y agente de bioconservación.	Tsaaqifah et al. (2023)

Inoculum of a Native Microbial Starter Cocktail to Optimize Fine-Aroma Cocoa (<i>Theobroma cacao</i>) Bean Fermentation. Agronomy	Eficacia de un cóctel de microorganismos nativos para controlar el proceso.	El cóctel nativo suprime hongos y logra una fermentación 24% mayor en 96 horas, destacando la relevancia de usar cepas adaptadas al ecosistema local.	Falconí et al. (2023)
---	---	---	-----------------------

En la Tabla 2 se presenta una breve recopilación de estudios donde se plantea y analiza el uso de la inoculación secuencial y la aplicación de cultivos indicadores en cacao.

Tabla 2. Estudios sobre aplicación de inoculación secuencial en la fermentación de cacao

Título	Microorganismos	Hallazgo	Referencia
Chemical implications and time reduction of on-farm cocoa fermentation by <i>Saccharomyces cerevisiae</i> and <i>Pichia kudriavzevii</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> y <i>Pichia kudriavzevii</i>	La mezcla de levaduras <i>S. cerevisiae</i> y <i>P. kudriavzevii</i> reduce la fermentación 24 horas, mejorando la calidad química del cacao.	Chagas-Junior et al. (2021)
Inoculum of a Native Microbial Starter Cocktail to Optimize Fine-Aroma Cocoa (<i>Theobroma cacao</i>) Bean Fermentation	<i>Torulaspora delbrueckii</i> , <i>Hanseniaspora uvarum</i> , <i>Limosilactobacillus plantarum</i> y <i>Acetobacter ghanensis</i> .	Un cóctel microbiano nativo suprime hongos, mejora el perfil bioquímico y logra una fermentación 24 % mayor en solo 96 horas.	Falconí et al. (2023)
Cocoa fermentations conducted with a defined microbial cocktail inoculum	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> , <i>Lactobacillus lactis</i> , <i>Lactobacillus plantarum</i> , <i>Acetobacter aceti</i> y <i>Gluconobacter oxydans</i> .	Un cóctel microbiano definido replicó la fermentación natural, pero la inoculación secuencial fue menos efectiva, mostrando la importancia de interacciones tempranas.	Schwan (1998)
Isolation of autochthonous microorganisms to formulate a defined inoculum for small-scale cocoa fermentation.	<i>Yarrowia lipolytica</i> , <i>Lactococcus lactis</i> y <i>Acetobacter aceti</i>	La inoculación secuencial de microorganismos nativos replicó exitosamente una fermentación espontánea ideal, produciendo granos de cacao de calidad homogénea.	Huerta-Conde et al. (2021)

CAPÍTULO 2

2 Metodología

2.1 Reactivación de microorganismos seleccionados

Para la elaboración de este estudio se emplearon los microorganismos seleccionados dentro del proyecto de investigación “Desarrollo de un cultivo iniciador para la fermentación de granos de cacao CCN-51 con la adición de pulpas de frutas. Fase III -2025-0115”, los cuales fueron aislados previamente de muestras de cacao de fermentación espontánea con inclusión de pulpa de frutas. Las cepas empleadas en este estudio fueron: *Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia kudriavzevii*, *Lactiplantibacillus plantarum* y *Acetobacter ghanensis*. Estos microorganismos se encuentran almacenados a -80 °C en el biobanco del Laboratorio de Biotecnología de la Universidad del Azuay.

La reactivación de los microorganismos se realizó en placa, según las condiciones establecidas en la Tabla 3. Cada cepa fue reactivada por duplicado y en todos los casos se incluyó un control negativo (blanco). Adicionalmente, como prueba preliminar para comprobar que los cultivos eran axénicos, se realizaron tinciones de Gram y azul de metileno para bacterias y levaduras, respectivamente.

Tabla 3. Medio y condiciones de cultivo para los microorganismos

Microorganismo	Medio de cultivo	pH	Condiciones de incubación
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	PDA	S/A	30 °C x 24 h
<i>Pichia kudriavzevii</i>	PDA	S/A	30 °C x 24 h
<i>Lactiplantibacillus plantarum</i>	MRS	5,5	36 °C x 24 h en anaerobiosis

Acetobacter ghanensis Medio de cultivo 4,5 30 °C x 48 h
descrito por Lefeber et
al. (2010)

Nota: Medio Papa, Dextrosa y Agar (PDA); Medio Man, Rogosa y Sharpe (MRS). Sin ajustar (S/A). Composición del medio de simulación de pulpa de cacao para BAA (PSM-AAB) (g/L): extracto de levadura (10), lactato de calcio pentahidratado (10), etanol (10), peptona (5) y Tween 80 (1) (Lefeber et al., 2010).

2.2 Determinación de curvas de crecimiento microbiano

Este análisis se destinó únicamente a las cepas bacterianas, dado que las levaduras presentaban un metabolismo más activo y un crecimiento acelerado. Tal como mencionan Changas et al. (2021), *Saccharomyces cerevisiae* y *Pichia kudriavzevii* suelen destacarse en las fermentaciones de cacao debido a su alta capacidad para adaptarse a diversas condiciones ambientales, lo cual se explica por su capacidad para tolerar elevadas temperaturas, pH bajo y alto contenido de etanol (Wang et al., 2023; Campos et al., 2025). Razón por la cual, para el caso de estos microorganismos, se optó por realizar una verificación de su viabilidad en medio líquido PDB y sembrado en placa con medio PDA. En el caso particular de *S. cerevisiae* se empleó un enriquecimiento con 2% de glucosa en el medio líquido.

Para obtener las curvas de crecimiento de cada microorganismo, las cepas reactivadas en placas se inocularon en medio líquido para su estandarización. A partir de las placas reactivadas, se seleccionaron alrededor de cinco colonias, y se inocularon en 10 mL en los medios líquidos específicos descritos en el apartado 3.1 para cada microorganismo. Posteriormente, después de su incubación en las condiciones presentadas en la Tabla 4, se determinó la densidad óptica (OD_{600}) de los preinóculos mediante un espectrofotómetro UV-Visible Genesys 50 (Thermo Scientific, Estados Unidos). Con estos se inoculó una solución madre, de la cual se distribuyeron 10 mL en matraces Erlenmeyer estériles asignados a distintos tiempos de monitoreo. En cada intervalo establecido se registró la OD_{600} en un espectrofotómetro de placas UV-Visible Epoch (BioTek, Estados Unidos). Adicionalmente, se tomó 1 mL del inóculo para realizar diluciones seriadas en agua peptona al 0,1% y se sembraron 100 μ L en placas con medios específicos de las diluciones 10^{-6} , 10^{-7} y 10^{-8} para determinar las unidades formadoras de colonias (UFC/mL).

Tabla 4. Condiciones de cultivo y parámetros de monitoreo para la evaluación cinética de *Lactiplantibacillus plantarum* y *Acetobacter ghanensis*

Microorganismo	Condiciones de crecimiento	Tiempo de incubación de preinóculo	Horas de monitoreo
<i>Lactiplantibacillus plantarum</i>	36 °C 150 rpm	19 h	14, 15, 16 y 17
<i>Acetobacter ghanensis</i>	30 °C 150 rpm	24 h	8, 9, 10, 11, 12 y 14

2.3 Preparación de los cultivos iniciadores

Para la preparación de los inóculos, se seleccionaron colonias aisladas de un cultivo en placa, que se emplearon como preinóculos en matraces Erlenmeyer con 20 mL de medio específico para cada cepa. Posteriormente, los cultivos fueron escalados a matraces Erlenmeyer con 100 mL del medio correspondiente, utilizando 4 mL de preinóculo estandarizado con una OD₆₀₀ de 0,5. Estos cultivos se incubaron en las condiciones óptimas previamente establecidas y durante el tiempo determinado según las curvas de crecimiento.

Las células obtenidas se centrifugaron a 9.000 rpm durante 20 minutos a 4 °C en una centrífuga Sorvall ST8R (Thermo Scientific, Estados Unidos). El pellet resultante fue pesado y posteriormente resuspendido en agua peptonada al 0,1%, con el objetivo de alcanzar una concentración aproximada de 1×10^5 a 1×10^6 UFC/g de cacao. El volumen de inóculo empleado se ajustó a 2 mL, para evitar una distribución irregular de los microorganismos en la masa de cacao.

Finalmente, para determinar la concentración real de UFC/mL del inóculo, se realizaron diluciones seriadas del resuspendido en el medio correspondiente y se sembraron en placa para su cuantificación.

2.4 Fermentación de cacao con adición secuencial de mezclas de microorganismos

Para este estudio se utilizaron mazorcas provenientes de fincas de la localidad de Putucay, provincia del Azuay, Ecuador (2°32'43.7''S, 79°23'03.8''W). El despulpado y proporciones de frutas empleados fueron los descritos en Vizcaino-Almeida et al. (2022) y Peña et al. (2023). Se trabajó con cinco tratamientos, analizados por duplicado y con un tamaño de 5 Kg de muestra para cada réplica. Primeramente, se realizó una mezcla completa de los granos de cacao con las pulpas de frutas y luego se distribuyó en envases plásticos perforados para facilitar la eliminación de exudados durante la fermentación (Anexo B). En la Tabla 5 se detallan los experimentos realizados.

Tabla 5. Protocolo experimental para los cinco tratamientos

Identificación	Experimento
ESC	Fermentación espontánea sin reemplazo de pulpa.
EPF	Fermentación espontánea con reemplazo de pulpa de maracuyá y banano.
TM	Fermentación con inoculación de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> , <i>Pichia kudriavzevii</i> , <i>Lactiplantibacillus plantarum</i> y <i>Acetobacter ghanensis</i> al tiempo cero.
BAL24	Fermentación con inoculación de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> y <i>Pichia kudriavzevii</i> al tiempo cero, <i>Lactiplantibacillus plantarum</i> a las 24 horas y <i>Acetobacter ghanensis</i> a las 72 horas.
BAA48	Fermentación con inoculación de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> , <i>Pichia kudriavzevii</i> y <i>Lactiplantibacillus plantarum</i> al tiempo cero, y <i>Acetobacter ghanensis</i> a las 48 horas.

La fermentación se llevó a cabo durante seis días en una cámara controlada, cuya temperatura se ajustó de la siguiente manera: 25 °C de 0 a 48 horas, 30 °C de 48 a 72 horas, 35 °C de 72 a 96 horas, 40 °C de 96 a 120 horas y 45 °C de 120 a 144 horas. Cada 24 horas se homogeneizaron las muestras con un instrumento estéril, a fin de simular el “volteo” que se realiza en la granja, seguido de un muestreo de aproximadamente 170 g de la mezcla en bolsas estériles. Posteriormente, se inocularon los microorganismos (si correspondía al tratamiento) y se homogeneizó nuevamente. Las muestras de granos de cacao se trasladaron a una cabina de flujo laminar previamente esterilizada. De estas, se seleccionaron entre 10 y 12 granos para la

medición inmediata del pH, mientras que el análisis del índice de fermentación se centró exclusivamente en los últimos tres días del proceso. Los granos restantes se mantuvieron en sus correspondientes bolsas y fueron almacenados en congelación a -80 °C (ARCTIKO, Denmark).

2.5 Determinación de Temperatura y pH

La temperatura de la masa de fermentación fue registrada mediante un datalogger (Elitech, Estados Unidos), configurado para tomar la temperatura interna de la masa de cacao en intervalos de una hora a lo largo de los seis días de tratamiento. De igual manera, cada día se realizaron mediciones de pH tanto internas como externas de los granos mediante un potenciómetro (SevenCompact S220, Mettler Toledo, Suiza), previamente calibrado y conforme al método descrito en la AOAC 970.21. En el caso del pH interno, se inició pelando los granos de cacao, los cuales luego se procesaron en un molino 80335G (Hamilton Beach, China) y se tomaron 10 gramos para adicionar 25 ml de agua desionizada. Dicha mezcla se dejó reposar por media hora, para finalmente filtrar y medir su pH por triplicado. Por otro lado, para el pH externo, únicamente se colocaron 20 mL de agua desionizada en un vaso de precipitación con cinco granos aún con restos de pulpa y tras media hora de reposo, se procedió a medir el pH por triplicado.

2.6 Índice de fermentación (IF)

Esta determinación se realizó a partir de las 96 horas de fermentación. Para ello, se siguió el método descrito por Gourieva y Tserrevitinov (1979) con algunas modificaciones. Se trituraron granos de cacao y se pesaron 250 mg. Se adicionó 25 mL de una solución Metanol:HCl (97:3 v/v), seguido de una incubación a 5 °C por 19 h. Transcurrido el tiempo, se empleó el protocolo de Streule et al. (2024), donde las muestras se filtraron a través de un papel Whatman. Se midió la absorbancia del filtrado a dos longitudes de onda por duplicado (460 y 530 nm) usando un espectrofotómetro de placas UV-Visible Epoch (BioTek, Estados Unidos). Estos valores se emplearon para el cálculo del ratio 460:530 nm, el cual corresponde al índice de fermentación.

2.7 Prueba de corte de los granos fermentados

Al finalizar la fermentación, los granos se secaron en un secador con aire caliente a 45 °C durante dos días hasta alcanzar un porcentaje de humedad inferior al 9 % mediante un medidor portátil para granos. Una vez alcanzado este porcentaje, se procedió a realizar una prueba de

corte para clasificar los granos bien fermentados, parcialmente fermentados y no fermentados/violetas conforme lo descrito por Hernández-Hernández et al. (2016).

2.8 Análisis metagenómico

Previo a la extracción de ADN, se trataron muestras de granos hasta la obtención de pellets de microorganismos. Para ello, se empleó muestras de cacao con pulpa previamente descongeladas, donde se seleccionaron de entre 5 a 8 granos de cacao con pulpa (equivalentes a un peso aproximado de 20 g), los cuales se mezclaron con 90 mL de solución salina. La mezcla se homogeneizó mediante movimientos circulares durante 5 minutos y se dejó decantar por 10 minutos para permitir la sedimentación de los sólidos de mayor tamaño. Posteriormente, el sobrenadante se transfirió a tubos Falcon y se centrifugó a 170 rcf durante 5 minutos a 4°C en una centrífuga Sorvall ST8R (Thermo Scientific, Estados Unidos). El líquido resultante fue filtrado en una cabina de flujo laminar utilizando filtros estériles de 125 mm con un poro de 15 a 20 µm. Finalmente, el filtrado se centrifugó a 8000 g por 20 minutos a 4°C en una centrífuga Sorvall ST8R (Thermo Scientific, Estados Unidos) para promover la formación del pellet. Tras eliminar el sobrenadante, los pellets obtenidos fueron rotulados y almacenados a -80°C.

Para la extracción del ADN metagenómico se utilizó el kit DNeasy PowerSoil Pro kit (QIAGEN, Alemania), conforme las indicaciones del fabricante. Posteriormente, la concentración y calidad del ADN extraído fueron determinadas utilizando el Qubit dsDNA BR Assay Kit (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific). Finalmente, las muestras fueron procesadas y secuenciadas mediante el kit Rapid Sequencing DNA V14 Barcoding (SQK-RBK114.24, Oxford Nanopore Technologies, Reino Unido). Las bibliotecas preparadas se cargaron en Flow cells R9.4.1 y se secuenciaron en el MinION (ONT, Reino Unido). El progreso de la secuenciación y del basecalling se controló con el programa MinKNOW (ONT, Reino Unido).

Las lecturas crudas de secuenciación para cada uno de los barcodes fueron sometidas a basecalling con el software Dorado (ONT) y clasificadas como “passed” o “failed”, si el Q-score fue superior o inferior a 7, respectivamente. Los archivos fastq que pasaron el filtro de calidad fueron cargados en la plataforma One Codex (<https://www.onecodex.com>), donde se realizó una clasificación taxonómica basada en coincidencias de K-meros, comparándolos con la base de datos propia de esta plataforma.

CAPÍTULO 3

3 Resultados y Discusión

3.1 Análisis de crecimiento de cultivos iniciadores

3.1.1 Curvas de crecimiento microbiano

En la cinética de crecimiento de *Acetobacter ghanensis*, la densidad óptica (OD₆₀₀) mostró un incremento progresivo a lo largo del tiempo, acompañado por un aumento en las unidades formadoras de colonias (UFC/mL). No obstante, se observó un incremento más pronunciado alrededor de las 10 horas de incubación, lo que sugiere el inicio de la fase exponencial (Figura 1). A partir de las 12 horas, se observa una disminución en la velocidad de crecimiento, indicando una transición hacia la fase estacionaria.

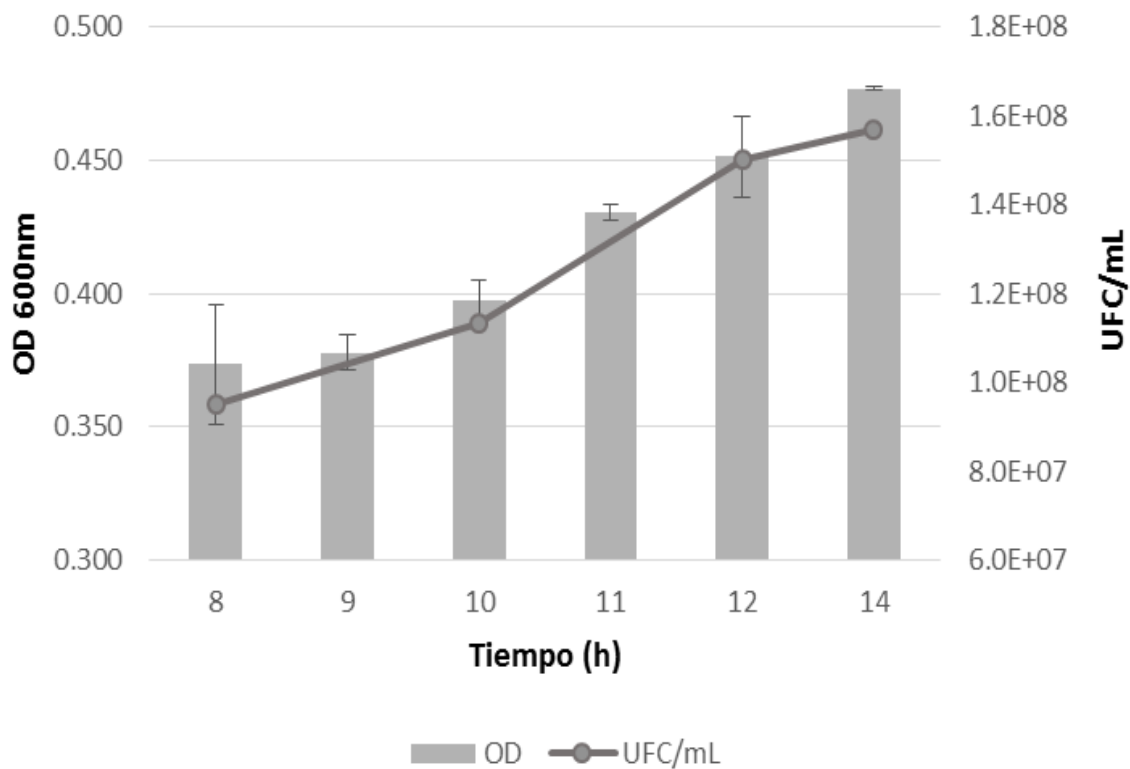


Figura 1. Cinética de crecimiento *Acetobacter ghanensis*. Las barras representan la OD₆₀₀ (n=6) y los puntos de dispersión las UFC/mL (n=4) Las barras de error indican la desviación estándar de la OD₆₀₀ entre las réplicas analizadas.

El valor de OD más alto registrado fue de OD₆₀₀ ≈ 0,450, a la cual le corresponde una concentración aproximada de 1,5×10⁸ UFC/mL. Este valor se alcanzó a las 12 horas de monitoreo y coincide con el punto de mayor actividad metabólica del cultivo. Este

comportamiento es consistente con la cinética de crecimiento microbiano descrita en la literatura, en la que se distinguen las fases de latencia, exponencial, estacionaria y de declive (Yates & Smotzer, 2007). Durante la fase exponencial, los microorganismos alcanzan su máxima tasa de división celular tras adaptarse al medio, mientras que en la fase estacionaria el crecimiento se ve limitado y tiende a disminuir debido a la disponibilidad de nutrientes y acumulación de metabolitos (Opalek et al., 2025).

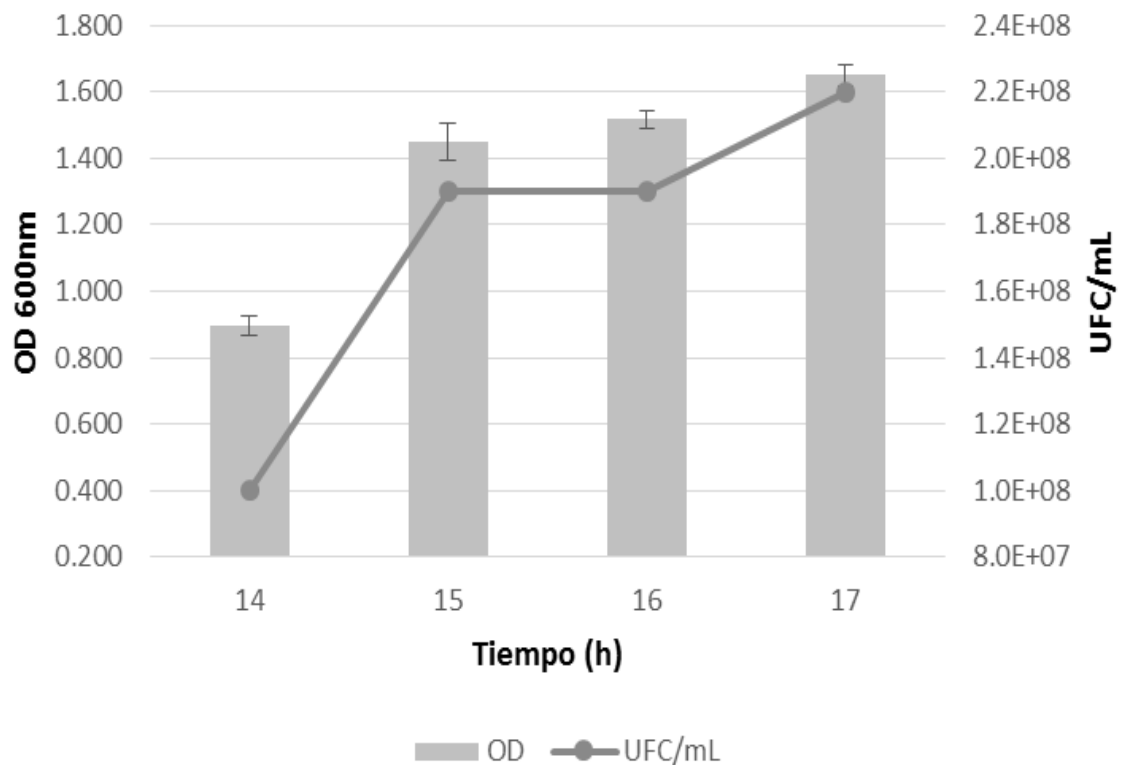


Figura 2. Cinética de crecimiento *Lactiplantibacillus plantarum*. Las barras representan la OD₆₀₀ (n=5) y los puntos de dispersión representan las UFC/mL de medio (n=2). Las barras de error indican la desviación estándar de la OD₆₀₀ entre las réplicas analizadas.

Por otro lado, en el caso de *Lactiplantibacillus plantarum*, a diferencia de lo observado con la bacteria acética, presentó una fase lag más prolongada (Figura 2). La fase exponencial se inició aproximadamente a las 14 horas de incubación, alcanzando su máxima tasa de crecimiento alrededor de las 15 horas. En este punto, se registró una OD₆₀₀ ≈ 1,45, correspondiente a una concentración celular de aproximadamente $1,9 \times 10^8$ UFC/mL. Posteriormente, se observa una disminución de la tasa de crecimiento, lo que sugiere la transición hacia la fase estacionaria.

Para interpretar adecuadamente estos resultados, es importante considerar que la densidad óptica no constituye una medida directa del número de células viables, sino que se basa en la dispersión de la luz por las partículas en suspensión (Beal et al., 2020). En este sentido, la relación entre la concentración celular y la OD₆₀₀ depende de varios factores, como la longitud del recorrido de la luz, el tamaño y el número de partículas o, en este caso, de las células microbianas (Mira et al., 2022).

En este sentido, las diferencias observadas entre las curvas de crecimiento de estas bacterias podrían estar influenciadas por sus características morfológicas. *L. plantarum*, se caracteriza por su forma de bacilos rectos de 0,9-1,2μm y 3-8μm, dispuestos en pares o cadenas cortas (Landete et al., 2021); mientras que *A. ghanensis* posee un tamaño entre 0,4-1μm de ancho y 0,8-4,5μm de largo (Guillamón & Mas, 2011). El mayor tamaño de *L. plantarum* podría explicar el aumento en la OD₆₀₀, sin que ello implique necesariamente un mayor número de células viables.

Adicionalmente, la diferencia observada en la duración de la fase lag entre ambas bacterias puede estar asociada a los procesos metabólicos propios de cada microorganismo y a la complejidad de sus mecanismos de adaptación a nuevos entornos. Por su parte, las BAA presentan un metabolismo oxidativo basado principalmente en la conversión de etanol a ácido acético (Han et al., 2024), lo que implica una vía relativamente directa de obtención de energía una vez que se dispone del sustrato y el oxígeno está disponible en el medio. Por su parte, *L. plantarum* posee un metabolismo heterofermentativo facultativo caracterizado por una alta capacidad de utilización de diferentes azúcares y un sistema complejo de transporte y regulación metabólica (Cui et al., 2021). En este sentido, la mayor duración de la fase lag observada en *L. plantarum* podría estar relacionada con la necesidad de activar sistemas de transporte y rutas metabólicas específicas antes de alcanzar su máxima tasa de crecimiento.

3.2 Fermentación secuencial de cacao

3.2.1 Análisis de temperatura y pH

La evolución de la temperatura durante el proceso fermentativo se muestra en la Figura 3. En términos generales, todos los tratamientos siguieron una tendencia creciente acorde al régimen térmico aplicado. Se puede observar cómo durante las primeras 24 horas los tratamientos inoculados presentaron una mayor temperatura en comparación con los tratamientos espontáneos. En este sentido, De Vuyst y Weckx (2016), explican que la producción de etanol por parte de las levaduras, es una reacción exotérmica que eleva la temperatura de la masa de

cacao desde la temperatura ambiente (25–30 °C) hasta 35–40 °C en 48 horas. En consecuencia, la diferencia observada sugiere que la inoculación de levaduras, estaría asociada con una aceleración en la liberación de calor metabólico, en comparación con la dinámica de una microflora espontánea.

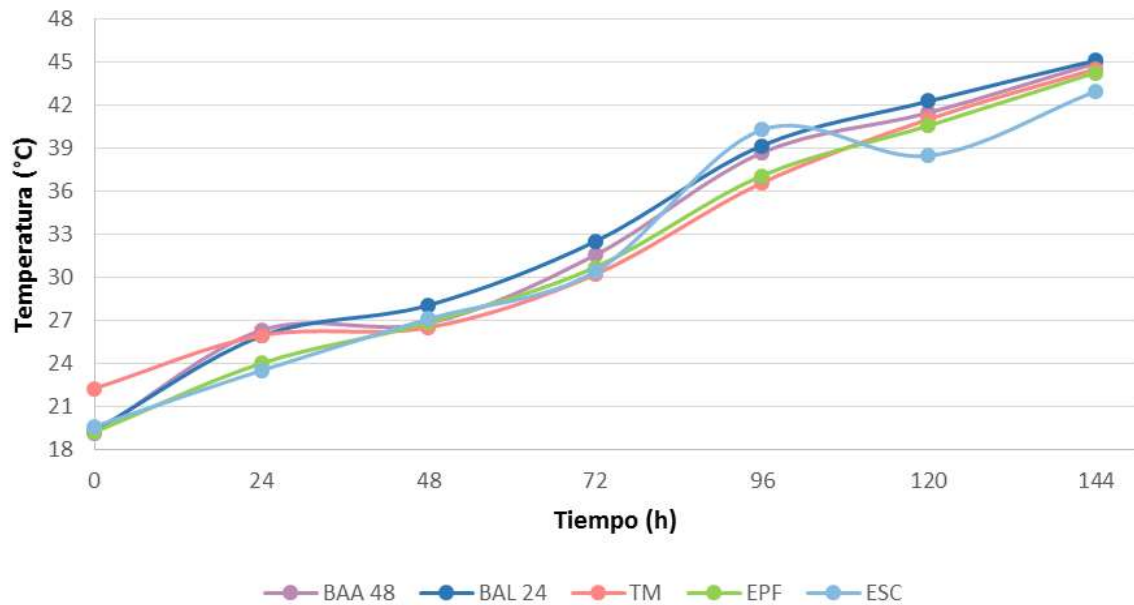


Figura 3. Dinámica de temperatura durante el proceso de fermentación. Valores promedio (n=2).

A partir de las 72 horas de fermentación, se observa una mayor divergencia entre las curvas térmicas. En este periodo se espera la proliferación de las bacterias ácido-acéticas (De Vuyst y Weckx, 2016). El metabolismo de estas bacterias, basado en la transformación del etanol en ácido acético y en la posterior degradación de este en dióxido de carbono y agua, es un proceso altamente exotérmico que eleva la temperatura de la masa hasta 50 °C o más (Schwan & Wheals, 2004). Bajo esta dinámica, el tratamiento BAL24, inoculado con *A. ghanensis* a las 72 horas, alcanzó los valores más altos durante el proceso, mientras que el tratamiento ESC mostró un comportamiento variable, con notorias oscilaciones térmicas. Hacia el final de la fermentación, las temperaturas tendieron a estabilizarse, lo que redujo las brechas entre los distintos tratamientos.

En cuanto a la evolución del pH externo (Figura 4), al inicio de la fermentación el tratamiento ESC inició con un pH externo de $3,57 \pm 0,007$ y finalizó en $4,3 \pm 0,098$, valores que coinciden con lo reportado por López Hernández et al. (2019) en fermentaciones de cacao CCN51. En contraste, los tratamientos con reemplazo de pulpa de fruta presentaron valores de pH inferiores

(≈ 3), debido al contenido de ácidos orgánicos aportados principalmente por la incorporación de maracuyá (Peña González et al., 2023), tendencia que se mantuvo hasta el final.

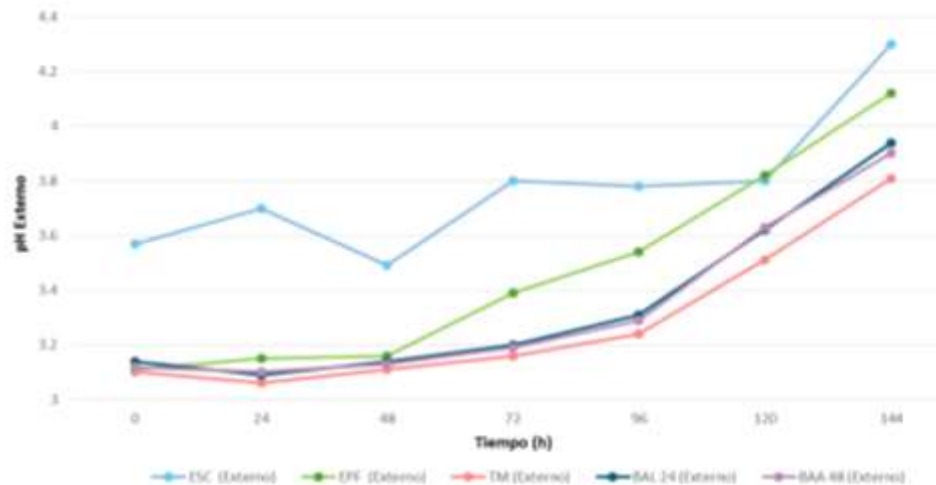


Figura 4. Dinámica de pH externo durante el proceso de fermentación. Valores promedio ($n=6$).

Los valores de pH interno al inicio del proceso fueron bastante similares entre todos los tratamientos ($\approx 6,5$), mismos que concuerdan con lo reportado por López Hernández et al. (2019), situándose en los niveles característicos del grano fresco (Figura 5). Por otro lado, hacia el final de la fermentación, el tratamiento ESC presentó la mayor acidificación interna (pH 4,53), lo que indica una mayor difusión de ácidos hacia el cotiledón en comparación con los tratamientos con adición de pulpa de fruta, los cuales mantuvieron niveles de pH superiores (EPF= $5,92\pm 0,06$, TM= $5,86\pm 0,12$, BAL24= $5,71\pm 0,21$, BAA48= $5,68\pm 0,29$). Esta acidificación del grano resulta determinante para la calidad final, ya que, según Afoakwa et al. (2008), un pH elevado (5,50–5,80) se asocia con granos subfermentados de sabores extraños, mientras que un pH excesivamente bajo ($< 4,75$) puede comprometer las notas de chocolate. En este contexto, se ha establecido un rango óptimo intermedio de pH (5,20–5,49) para maximizar la intensidad sensorial.

Bajo este criterio, el tratamiento ESC presentó una acidificación excesiva que comprometió el perfil sensorial de los granos, lo cual se corroboró experimentalmente durante los últimos días de la fermentación e incluso tras el proceso de secado, en los que se detectaron aromas atípicos y notas avinagradas. Por el contrario, los tratamientos con reemplazo de la pulpa, aunque se situaron técnicamente en el rango de subfermentación, demostraron una mayor calidad aromática, lo que podría indicar que la inclusión de frutas podría cambiar el rango óptimo de pH al final de la fermentación.

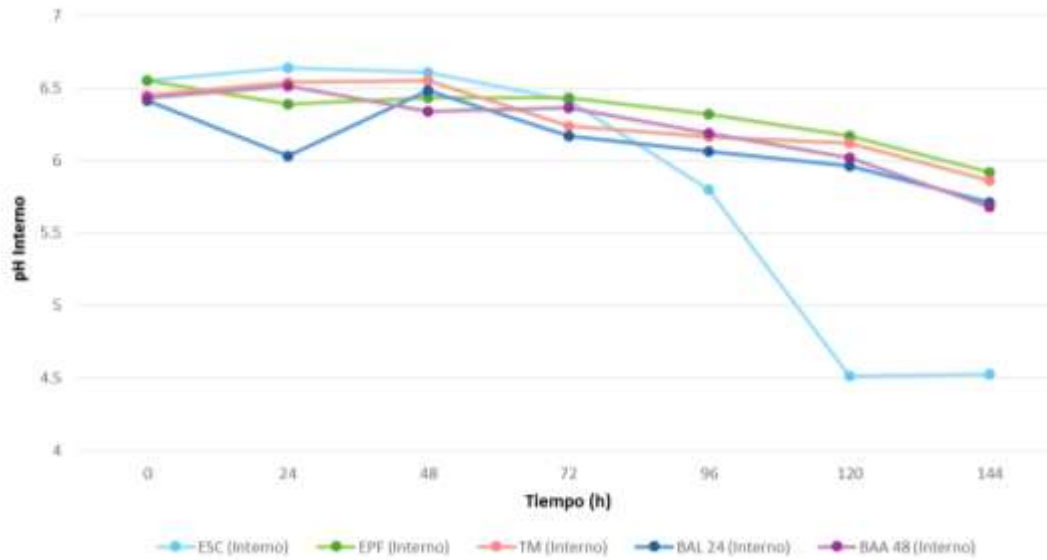


Figura 5. Dinámica de pH interno durante el proceso de fermentación. Valores promedio (n=6).

3.2.2 Diversidad microbiana

A partir de los resultados metagenómicos, se evidenció una gran variedad de microorganismos al inicio de la fermentación (Día 0), que tiende a reducirse conforme avanza el proceso, lo cual es más notorio en las fermentaciones espontáneas. Tanto en los tratamientos ESC y EPF (Figura 6), las enterobacterias fueron las más abundantes (*Dickeya*, *Enterobacter*, *Erwinia*, *Escherichia*, *Klebsiella*, *Pantoea* y *Yersinia*). Según Viesser et al. (2021), estos microorganismos son indicadores de higiene y es importante que no dominen el proceso para no afectar la calidad final de los granos. Además, estos autores señalan que *Erwinia*, *Tatumella* y *Pantoea* se consideran fitopatógenos y que durante la fase inicial de la fermentación podrían participar en la degradación de pectinas y ácido cítrico.

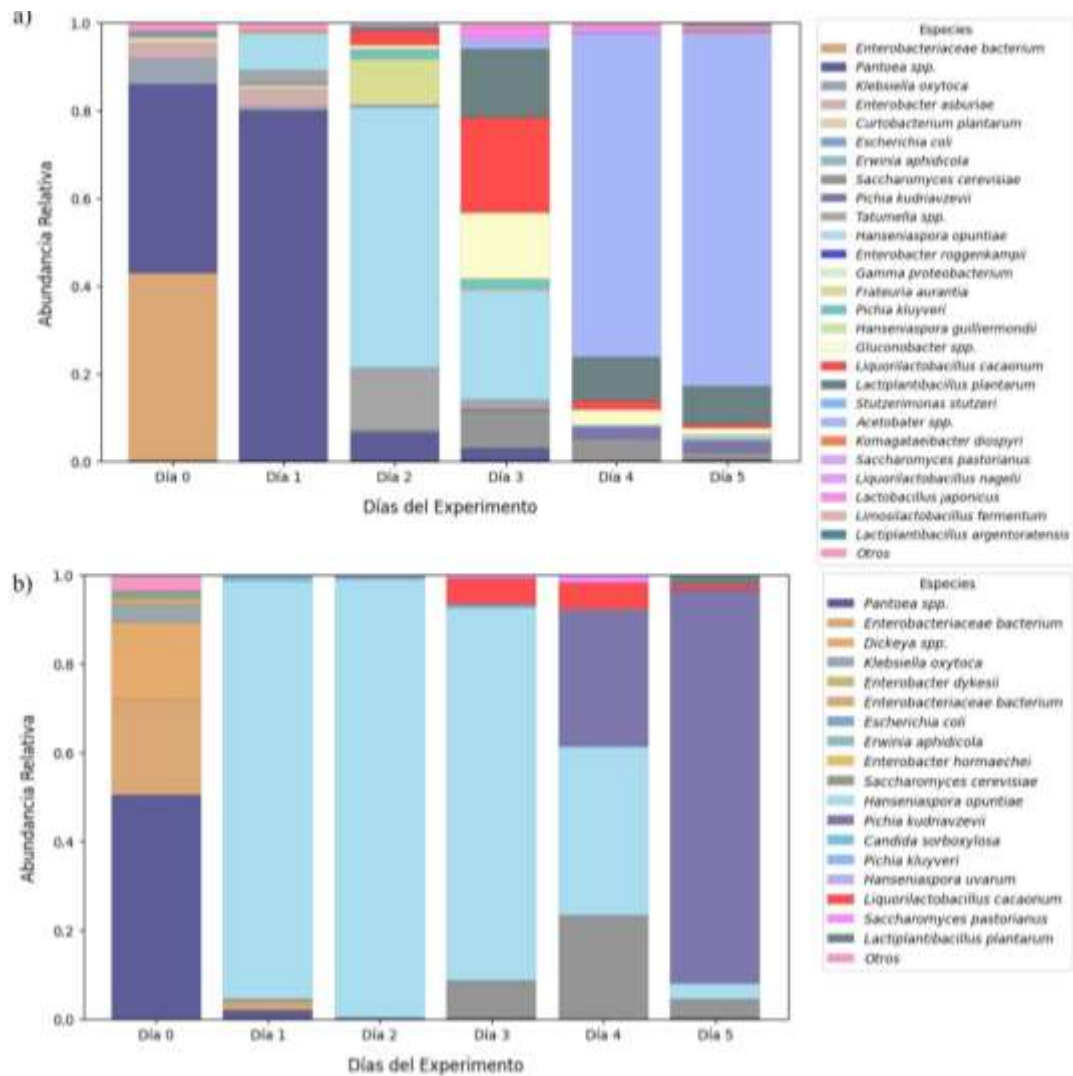


Figura 6. Gráfica de análisis metagenómico para tratamientos espontáneos. a) Tratamiento ESC. b) Tratamiento EPF.

En los tratamientos inoculados, se confirmó la presencia de *S. cerevisiae* y *P. kudriavzevii*, validando la viabilidad del inóculo utilizado. Particularmente en el tratamiento TM, la adición de *Acetobacter ghanensis* y *Lactiplantibacillus plantarum* también resultó efectiva. No obstante, tanto TM como BAL24 exhibieron contaminación por *Pantoea spp.*; por el contrario, BAA48 mostró una abundancia relativa dominada por levaduras, factor que limitó la diversidad de especies detectadas (Figura 7).

A medida que avanzó la fermentación (Día 1 al 3), los experimentos de fermentación espontánea mantuvieron una diversidad microbiana más amplia y variada que los inoculados. En el tratamiento ESC, destacó la presencia inicial de *Pantoea spp.*, la cual fue desplazada a partir del segundo día por *Hanseniaspora spp.* y la aparición de BAL como *Liquorilactobacillus cacaonum* y *Lactiplantibacillus plantarum*. En contraste, en el tratamiento EPF, *Hanseniaspora opuntiae* dominó la dinámica desde las 24 horas, mientras

que las BAL (*L. cacaonum*) aparecieron al tercer día. Esta observación podría asociarse al reemplazo de la pulpa, puesto que la diferencia de acidez entre tratamientos (Figura 4) posiblemente condicione la supervivencia de ciertas especies.

En cuanto a los tratamientos inoculados, las levaduras dominaron el proceso; sin embargo, la dinámica entre *S. cerevisiae* y *P. kudriavzevii* parece cambiar, siendo esta última la que cobra mayor relevancia con el transcurso del tiempo. El comportamiento de los tratamientos inoculados respecto a los experimentos de fermentación espontánea resalta una de las ventajas del uso de cultivos iniciadores, la capacidad de generar perfiles microbianos más consistentes y controlados entre diferentes lotes siendo clave para estandarizar la calidad del producto final y reducir riesgos de defectos asociados a la fermentación espontánea (Campos et al., 2025).

Para el final de la fermentación (Día 4 al 5), en ESC las BAA ganan una relevancia notable en la comunidad microbiana. Este cambio en el dominio de las especies coincidiría con la rápida acidificación detectada en las mediciones de pH (Figura 4). En contraste, el tratamiento EPF presenta una dinámica similar a los tratamientos inoculados; es decir, las levaduras dominaron la dinámica, pero con mayor diversidad de especies. En el caso de TM, BAL24 y BAA48, se observa una porción muy pequeña de abundancia relativa para *L. plantarum*, mientras que *A. ghanensis* no tuvo relevancia en ninguno de los tratamientos. Estos aspectos pueden relacionarse con el lento aumento del pH externo y la escasa acidificación del pH interno (Figura 4), ya que impiden la metabolización de ácido cítrico (BAL) y la producción de ácido acético (BAA) (De Vuyst & Leroy, 2020). Esta dinámica es similar a la reportada por Schwan (1998), en la que las poblaciones de BAL y BAA disminuyeron hasta volverse indetectables en tratamientos con inoculación en tiempo cero y secuencial. Este resultado sugiere que, aunque la optimización de las bacterias mediante curvas de crecimiento fue efectiva para garantizar la adición de células viables a la masa de fermentación (Anexo A), estas no lograron proliferar significativamente durante el proceso. Una posible explicación es la elevada carga de levaduras presentes en la fermentación, las cuales pudieron ejercer un efecto competitivo sobre las bacterias inoculadas, limitando su desarrollo y predominancia microbiana.

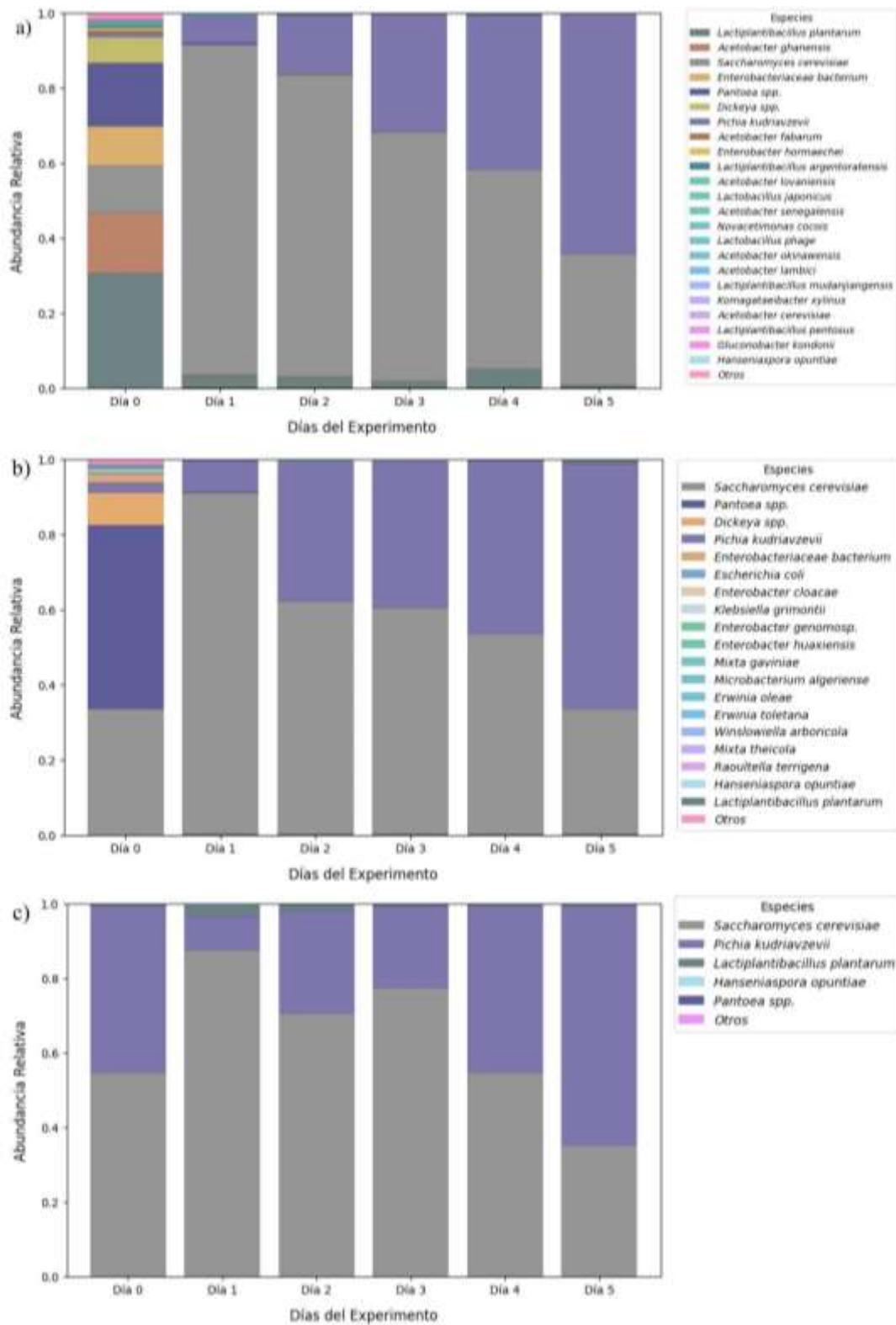


Figura 7. Gráfica de análisis metagenómico para tratamientos inoculados. a) Tratamiento TM; b) Tratamiento BAL24; c) Tratamiento BAA4

Además, es importante considerar que los valores representados en las gráficas corresponden a abundancia relativa y no a conteos de UFC/g. Por tanto, estos resultados no reflejan directamente la densidad celular de cada grupo microbiano, sino una estimación de los microorganismos que alcanzaron una mayor predominancia en la fermentación. En este contexto, la mayor proporción de levaduras respecto a las bacterias probablemente enmascaró la presencia de estas últimas.

3.3 Determinación de índice de fermentación

El índice de fermentación es un indicador ampliamente utilizado para evaluar el grado de degradación de compuestos fenólicos en la fermentación de los granos de cacao. Aquellos valores cercanos o superiores a 1 representan un grado de fermentación adecuada (Kongor et al., 2013); mientras que valores inferiores representan una fermentación insuficiente, y valores superiores a 1,2 corresponden a granos sobre fermentados (Teneda, 2016).

Los valores obtenidos a las 96 horas de fermentación oscilaron entre 0,46 y 0,57, siendo el tratamiento BAL24 el que registró el mayor valor, mientras que TM presentó un menor valor. No obstante, no se evidenciaron diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos ($p>0,05$), lo que sugiere un grado de fermentación aún incipiente en esta etapa.

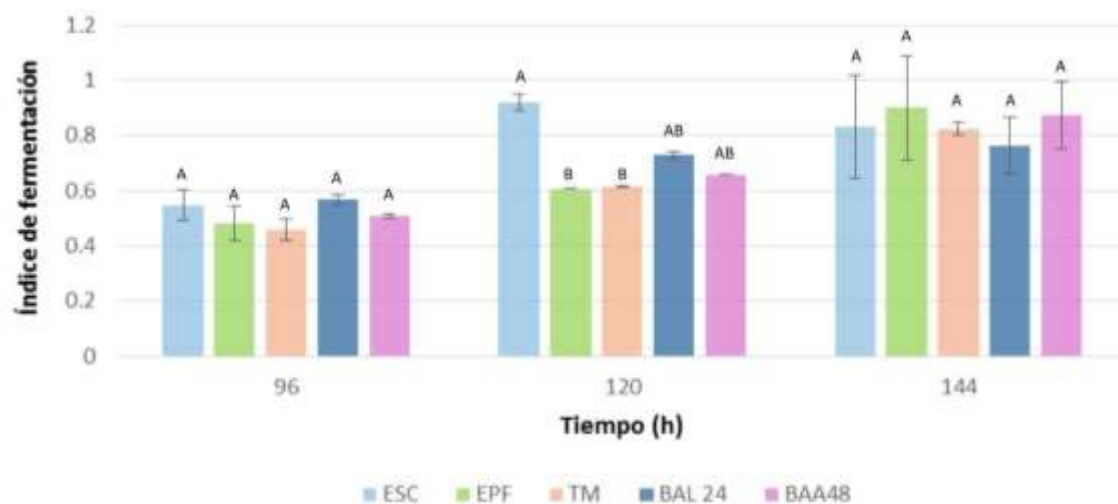


Figura 8. Índice de fermentación. Las barras representan los valores promedio (n=18) junto con su desviación estándar. Letra diferente en el mismo periodo de tiempo indica diferencias significativas (test t, alfa=0.05).

A las 120 horas, se registró un incremento notable del índice de fermentación en el tratamiento ESC, el cual alcanzó los valores más altos en todo el proceso en comparación con los demás tratamientos (Anexo E). Este resultado se correlaciona con los cambios físicos observados en

los granos durante el experimento, donde se pudo observar la aparición de surcos y la transición hacia un color café uniforme, características que, según Contreras et al. (2025), resultan ser propias de granos bien fermentados. Por el contrario, los demás tratamientos presentaron una coloración variable, con predominancia de tonalidades violetas, lo que sugiere un menor grado de fermentación. Esto se pudo ver reflejado en el análisis estadístico demostrando diferencias significativas principalmente entre los tratamientos ESC, EPF y TM.

El comportamiento del tratamiento ESC puede asociarse con una mayor actividad fermentativa, evidenciada por una mayor acidificación interna tal como se describió en el análisis del pH interno (sección 3.2.1). Este resultado sugiere una mayor penetración de ácidos orgánicos hacia el cotiledón, probablemente, relacionada con la actividad de BAA hacia el final de la fermentación mostrada en el análisis metagenómico. Estos factores, junto con las altas temperaturas reportadas en el tratamiento, favorecen la muerte del embrión y la activación de enzimas oxidativas responsables de la degradación de polifenoles (Mota-Gutiérrez et al., 2018). En el caso de los tratamientos inoculados, se observó una menor acidificación del cotiledón, así como una sucesión microbiana deficiente, lo que se refleja en los resultados en una menor evolución del grado de fermentación.

Por otro lado, a las 144 horas no se detectaron diferencias significativas entre los tratamientos ($p > 0,05$), por lo que al final del proceso se obtuvo un grado de fermentación comparable entre los tratamientos evaluados. Sin embargo, dado que los valores se mantuvieron por debajo del nivel óptimo reportado en la literatura, se puede inferir que el proceso no alcanzó un nivel de fermentación completamente adecuado. Estos resultados difieren de los reportados por Chagas-Junior et al. (2021), quienes alcanzaron una buena fermentación a las 144 horas empleando un cultivo iniciador de *S. cerevisiae* y *P. kudriavzevii* en fermentaciones realizadas en cajas de madera con aproximadamente 50 kg de cacao. De igual manera, en estudios de Falconí et al. (2023) se obtuvo una reducción del tiempo de fermentación hasta 96 horas y mejoras en la calidad química del cacao Nacional, empleando sacos de yute con 60 kg de cacao y aplicando un cultivo iniciador con *Torulaspora delbrueckii*, *Hanseniaspora uvarum*, *Limosilactobacillus plantarum* y *A. ghanensis*.

Al comparar dichos estudios con los resultados de esta investigación, se puede deducir que la inoculación secuencial no evidenció un efecto favorable sobre el grado de fermentación, posiblemente debido a que no se logró establecer una sucesión microbiana eficiente durante el

proceso, como se observa en los resultados metagenómicos obtenidos (sección 3.2.2). Este comportamiento coincide con lo reportado por Schwan (1998), quien señala que la inoculación secuencial puede resultar poco efectiva cuando las condiciones del proceso no favorecen el establecimiento y predominio de los microorganismos inoculados dentro de la dinámica microbiana de la fermentación.

En contraste, si bien, según lo descrito por Casco et al. (2024), la duración de fermentaciones de cacao CCN-51 suele ser entre 6 - 7 días, en este análisis se pudo observar que el tratamiento ESC obtuvo un IF cercano a 1 a las 120 horas junto con un pH interno de 4,5. La prolongación de la fermentación por 24 horas adicionales pudo haber influido negativamente en las características sensoriales del cacao, favoreciendo el desarrollo de sabores excesivamente ácidos, lo que sugiere que el tiempo óptimo de fermentación para este tratamiento puede situarse en los cinco días.

3.4 Prueba de corte

Se pudo evidenciar que el tratamiento BAA48 alcanzó el mayor porcentaje de granos bien fermentados, con un 41% y una puntuación de 575, de acuerdo con el criterio propuesto por Hernández-Hernández et al. (2016), seguido por el tratamiento ESC, que presentó un 35% de granos bien fermentados y una puntuación de 560 (Figura 9). No obstante, en el caso de ESC se observó una marcada variabilidad entre réplicas biológicas, ya que al contrastar los resultados del índice de fermentación y de la prueba de corte se evidenció que una réplica alcanzó un nivel satisfactorio de fermentación, mientras que la otra presentó un desarrollo inferior (Anexo C y D). Esta menor reproducibilidad podría atribuirse a la naturaleza espontánea del tratamiento, en el que la dinámica microbiana y las condiciones del proceso tienden a ser menos uniformes que en fermentaciones inoculadas.

Por otro lado, el tratamiento BAL24 presentó la mayor proporción de granos violetas y la menor cantidad de granos bien fermentados, comportamiento que coincide con sus menores valores de índice de fermentación respecto a los demás tratamientos. La elevada presencia de granos violetas indicaría una menor degradación de antocianinas y un menor avance de los procesos oxidativos al interior del grano. En este sentido, Macedo et al. (2016) reportan que la enzima polifenol oxidasa (PPO), responsable de la transformación del grano hacia tonalidades cafés y de la reducción de la astringencia, presenta su máxima actividad en rangos de pH entre 5,8 y

6,6 y temperaturas de 25 a 30 °C. Conforme la fermentación progresa hacia condiciones más ácidas (pH cercano a 4,5) y temperaturas elevadas (35–45 °C), la actividad enzimática disminuye considerablemente. De acuerdo con los perfiles de pH y temperatura registrados en esta investigación, todos los tratamientos habrían alcanzado condiciones relativamente favorables para la actividad de la PPO entre las 48 y 72 horas, etapa en la que probablemente se intensificaron las reacciones de oxidación de polifenoles. Sin embargo, la mayor proporción de granos violetas en BAL24 sugiere que dichas transformaciones no ocurrieron con la misma intensidad o uniformidad que en los demás tratamientos.

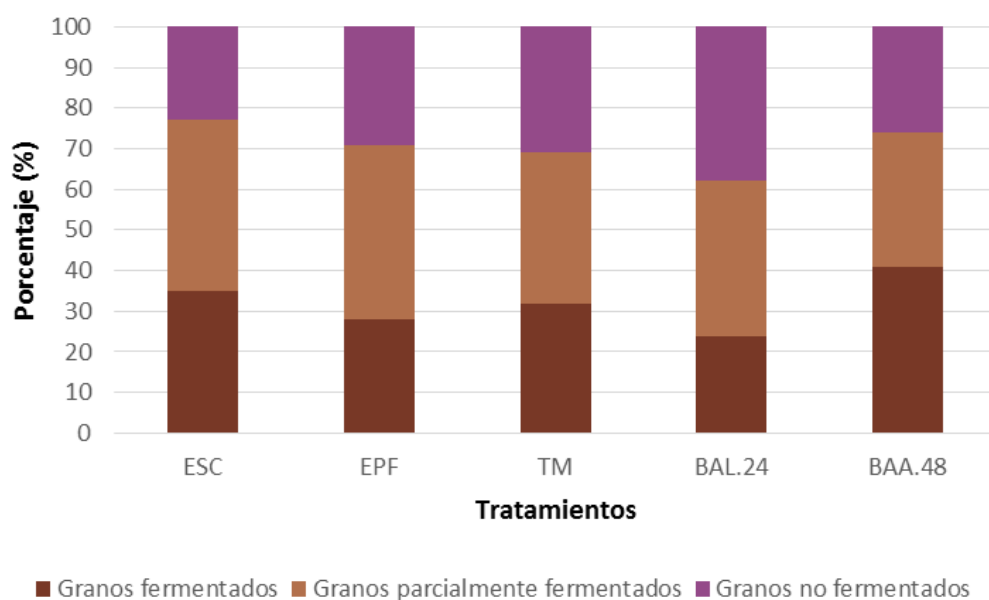


Figura 9. Gráfica del porcentaje de fermentación del cacao según la prueba de corte. Las barras se realizaron con los valores promedio (n=2), para un total de 100 granos analizados por tratamiento.

Adicionalmente, se contrastaron los resultados con la norma NTE INEN 176, la cual establece los requisitos de calidad para los granos de cacao, clasificándolos en tres categorías según diversos parámetros físicos. Uno de los indicadores críticos es el porcentaje máximo de granos violetas, con límites de 15%, 21% y 25% para los grados 1, 2 y 3, respectivamente. Bajo este criterio, la mayoría de los experimentos no alcanzaron los estándares de los dos primeros niveles, siendo el tratamiento ESC el único capaz de cumplir con este parámetro para su clasificación en el grado 3.

4 Conclusiones

En relación con el establecimiento de las condiciones óptimas para el cultivo iniciador, se determinó que la viabilidad y la cinética de adaptación microbiana están estrechamente ligadas al monitoreo preciso de las fases de crecimiento. Se identificó que *Acetobacter ghanensis* y *Lactiplantibacillus plantarum* presentan comportamientos metabólicos diferenciados, donde la estandarización de los inóculos en concentraciones de 1×10^5 UFC/g a 1×10^6 UFC/g resultó fundamental para garantizar una carga microbiana competitiva. Asimismo, el protocolo de inoculación secuencial a escala de laboratorio permitió replicar la dinámica sucesional de la fermentación del cacao. No obstante, el análisis metagenómico sugiere que la adición de pulpa de frutas modificó la competencia por el sustrato, favoreciendo una dominancia prolongada de las levaduras, lo que limitó la proliferación esperada de las bacterias ácido-lácticas y acéticas en las etapas finales del proceso.

En cuanto a la caracterización fisicoquímica, el uso de mezclas de maracuyá y banano como sustitutos del mucílago original generó cambios importantes a nivel de pH, mostrando niveles de pH externo significativamente más bajos desde el inicio del proceso. Aunque los tratamientos inoculados alcanzaron los picos térmicos necesarios para la muerte del embrión, el pH interno de los cotiledones se mantuvo por encima de los límites estándar de fermentación completa, situándose en un rango de subfermentación. Este comportamiento se alinea con lo resultados obtenidos en la prueba de corte, donde los granos provenientes de los tratamientos con pulpa de fruta mostraron una coloración violeta de mayor proporción a diferencia del tratamiento espontáneo solo cacao (ESC), que mostró una mayor proporción de granos bien fermentados alcanzando un grado 3 para granos de cacao según la norma NTE INEN 176.

Finalmente, es pertinente destacar que, a pesar de la superioridad técnica del tratamiento ESC en cuanto a indicadores físicoquímicos de fermentación, este presentó perfiles de aroma indeseables que no se manifestaron en los tratamientos inoculados con pulpa de fruta. Esto plantea la posibilidad de que el reemplazo de mucílago constituya una condición disruptiva en los parámetros de calidad conocidos que mejore el perfil aromático de los granos. De esta forma, es importante realizar investigaciones complementarias que integren análisis sensoriales y de metabolitos para comprender las causas de esta mitigación de olores y determinar qué componentes específicos de las pulpas están influyendo en la dinámica fermentativa.

5 Recomendaciones

A partir de los hallazgos obtenidos en la dinámica microbiana, se recomienda ajustar el protocolo de inoculación incrementando la densidad celular de las bacterias ácido-lácticas y acéticas, o bien reducir la carga de levaduras inoculadas. Esta modificación es crucial para contrarrestar la dominancia de las levaduras observada en los análisis metagenómicos, asegurando que la sucesión microbiana sea lo suficientemente robusta para completar la transformación química del cotiledón.

Adicionalmente, resulta fundamental realizar otros estudios complementarios como análisis sensorial y cuantificación de compuestos volátiles. Esta información resulta clave para confirmar si las modificaciones realizadas en el proceso de fermentación se traducen en una mejora del perfil sensorial de los granos de cacao.

Finalmente, se recomienda realizar un estudio de escalado a mayores volúmenes con el fin de evaluar si el comportamiento observado a escala piloto se mantiene bajo condiciones reales. Esta validación permitiría determinar la viabilidad de su implementación como herramienta tecnológica en la industria del cacao CCN-51 en Ecuador.

6 Referencias

- Afoakwa, E. O., Paterson, A., Fowler, M., & Ryan, A. (2008). Flavor formation and character in cocoa and chocolate: A critical review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 48(9), 840–857. <https://doi.org/10.1080/10408390701719272>.
- Afoakwa, E. O., Quintin, J., Agnes, S. B., & Saalia, F. K. (2012). Influence of pulp-preconditioning and fermentation on fermentative quality and appearance of ghanaiian. *International Food Research Journal*, 19(1), 127–133.
- Association of Official Analytical Chemists. (2023). *Official Method 970.21: pH of Cacao Products: Potentiometric Method* (22nd ed.). AOAC International.
- Balcázar-Zumaeta, CR, Pajuelo-Muñoz, AJ, Trigos-Rojas, DF, Iliquin-Chavez, AF, Fernández-Romero, E., Yoplac, I., Muñoz-Astecker, LD, Rodríguez-Hamamura, N., Maza Mejía, IM, Cayo-Colca, IS, Chagas-Junior, GCA, Maicelo-Quintana, JL, & Castro-Alayo, EM (2023). Reduction in the Cocoa Spontaneous and Starter Culture Fermentation Time Based on the Antioxidant Profile Characterization. *Foods*, 12 (17), 3291. <https://doi.org/10.3390/foods12173291>
- 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. *LWT - Food Science and Technology*, 63(1), 221–227. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2015.03.051>
- Beal, J., Farny, N. G., Haddock-Angelli, T., Selvarajah, V., Baldwin, G. S., Buckley-Taylor, R., Gershater, M., Kiga, D., Marken, J., Sanchania, V., Sison, A., Workman, C. T., Pehlivan, M., Roige, B. B., Aarnio, T., Kivisto, S., Koski, J., Lehtonen, L., Pezzutto, D., ... Zhou, J. (2020). Robust estimation of bacterial cell count from optical density. *Communications Biology*, 3(1). <https://doi.org/10.1038/s42003-020-01127-5>
- Boza, E. J., Motamayor, J. C., Amores, F. M., Cedeño-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. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 139(2), 219–229. <https://doi.org/10.21273/JASHS.139.2.219>
- Campos, S. d. M., Martínez-Burgos, W. J., dos Reis, G. A., Ocán-Torres, D. Y., dos Santos Costa, G., Rosas Vega, F., Alvarez Badel, B., Sotelo Coronado, L., Lima Serra, J., & Soccol, C. R. (2025). The role of microbial dynamics, sensorial compounds, and producing regions in cocoa fermentation. *Microbiology Research*, 16(4), 75. <https://doi.org/10.3390/microbiolres16040075>
- Camu, N., De Winter, T., Verbrugghe, K., Cleenwerck, I., Vandamme, P., Takrama, J. S., Vancanneyt, M., & De Vuyst, L. (2007). Dynamics and biodiversity of populations of lactic acid bacteria and acetic acid bacteria involved in spontaneous heap fermentation of cocoa beans in Ghana. *Applied and Environmental Microbiology*, 73(6), 1809–1824. <https://doi.org/10.1128/AEM.02189-06>
- Cerón, X., García, M., Rodríguez, E., Cubillos, A., Polanco, E., López, M. del P., Parra, E., Moreno, J., & Quiñones, F. (2020). *Estrategias tecnológicas para el manejo del cultivo y el beneficio del cacao*. Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria (AGROSAVIA). <https://doi.org/10.21930/agrosavia.institucional.7403572>

- Chagas-Junior, G. C. A., Ferreira, N. R., Gloria, M. B. A., Martins, L. H. da S., & Lopes, A. S. (2021). Chemical implications and time reduction of on-farm cocoa fermentation by *Saccharomyces cerevisiae* and *Pichia kudriavzevii*. *Food Chemistry*, 338, 127834. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.127834>
- Constante, M., Tigrero-Vaca, J., Villavicencio-Vasquez, M., Coello, D., Cevallos, J., & Coronel-León, J. (2024). Evaluation of stress tolerance and design of alternative culture media for the production of fermentation starter cultures in cacao. *Heliyon*.
- Criollo-Nuñez, J., Sandoval- Aldana, A. P., Bolívar, G., & Ramírez, C. (2024). Selección de levaduras promisorias para el desarrollo de un iniciador microbiológico promotor de la fermentación del cacao. *Ingeniería y Competitividad*, 26(2). <https://doi.org/10.25100/iyc.v26i2.13296>
- Cui, Y., Wang, M., Zheng, Y., Miao, K., & Qu, X. (2021). The Carbohydrate Metabolism of *Lactiplantibacillus plantarum*. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(24), 13452. <https://doi.org/10.3390/ijms222413452>
- De Vuyst, L., & Leroy, F. (2020). Functional role of yeasts, lactic acid bacteria and acetic acid bacteria in cocoa fermentation processes. *FEMS Microbiology Reviews*, 44(4), 432–453. 1 <https://doi.org/10.1093/femsre/fuaa014>
- De Vuyst, L., & Weckx, S. (2016). The cocoa bean fermentation process: from ecosystem analysis to starter culture development. *Journal of applied microbiology*, 121(1), 5–17. <https://doi.org/10.1111/jam.13045>
- 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>
- Falconí, C. E., Yáñez-Mendizábal, V., Haro, R. J., & Claudio, D. R. (2023). Inoculum of a Native Microbial Starter Cocktail to Optimize Fine-Aroma Cocoa (*Theobroma cacao*) Bean Fermentation. *Agronomy*, 13(10), 2572. <https://doi.org/10.3390/agronomy13102572>
- Flórez Quintana, L. C., Alarcón García, C. E., & Pineda Moreno, M. E. (2015). Perfil sensorial del Clon de cacao (*Theobroma cacao* L.) CCN51. @limentech, *Ciencia y Tecnología Alimentaria*, 13(1), 60–65. <https://doi.org/10.24054/16927125.v1.n1.2015.1866>
- Guillamón, J. M., & Mas, A. (2011). Acetic Acid Bacteria. *Molecular Wine Microbiology*, 227–255. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-375021-1.10009-8>
- Gourieva, K. B., & Tserrevitinov, O. B. (1979). *Method of evaluating the degree of fermentation of cocoa beans* (USSR Patent No. 646254).
- Han, D., Yang, Y., Guo, Z., Dai, S., Jiang, M., Zhu, Y., Wang, Y., Yu, Z., Wang, K., Rong, C., & Yu, Y. (2024). A Review on the Interaction of Acetic Acid Bacteria and Microbes in Food Fermentation: A Microbial Ecology Perspective. *Foods*, 13(16), 2534. <https://doi.org/10.3390/foods13162534>
- Hernández-Hernández, C., López-Andrade, P. A., Ramírez-Guillermo, M. A., Guerra Ramírez, D., & Caballero Pérez, J. F. (2016). Evaluation of different fermentation processes for use by small cocoa growers in Mexico. *Food science & nutrition*, 4(5), 690–695. <https://doi.org/10.1002/fsn3.333>
- Huerta-Conde, J. A., Schorr-Galindo, S., Figueroa-Hernández, C., Hernández-Estrada, Z. J., Suárez-Quiroz, M. L., & González-Rios, O. (2021). Isolation of autochthonous

- microorganisms to formulate a defined inoculum for small-scale cocoa fermentation. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*, 20(1), 239–256. <https://doi.org/10.24275/rmiq/Bio1869>
- Illegghems, K., Pelicaen, R., De Vuyst, L., & Weckx, S. (2016). Assessment of the contribution of cocoa-derived strains of *Acetobacter ghanensis* and *Acetobacter senegalensis* to the cocoa bean fermentation process through a genomic approach. *Food Microbiology*, 58, 68–78. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2016.03.013>
- Instituto Ecuatoriano de Normalización. (2021). *Granos de cacao Requisitos (NTE INEN 176)*. INEN. <https://anecacao.com/wp-content/uploads/2024/04/NTE-INEN-176-SEXTA-REVISION-1.pdf>
- Jaimez, R., Barragán, L., Fernández-Niño, M., Wessjohann, L. A., Cedeño-García, G., Cantos, I. S., & Arteaga, F. (2022). *Theobroma cacao* L. cultivar CCN 51: a comprehensive review on origin, genetics, sensory properties, production dynamics, and physiological aspects. *PeerJ*, 10: e12676. <https://doi.org/10.7717/peerj.12676>
- Kadow, D., Bohlmann, J., Phillips, W., & Lieberei, R. (2013). Identification of main fine or flavour components in two genotypes of the cocoa tree (*Theobroma cacao* L.). *Journal of Applied Botany and Food Quality*, 86(1), 90–98. <https://doi.org/10.5073/JABFQ.2013.086.01>
- Kongor, J. E., Hinneh, M., Van de Walle, D., 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>
- Kotey, R. N., Odoom, D. A., Kumah, P., Akowuah, J. O., Donkor, E. F., Quartey, E. K., Sam, E. K., Owusu-Kwarteng, J., Santo, K. G., Kwami-Adala, F., & Boateng, D. O. (2022). Effects of Fermentation Periods and Drying Methods on Postharvest Quality of Cocoa (*Theobroma Cacao*) Beans in Ghana. *Journal of Food Quality*, 2022, 1–14. <https://doi.org/10.1155/2022/7871543>
- Landete, J. M., Rodríguez, H., Curiel, J. A., de las Rivas, B., de Felipe, F. L., & Muñoz, R. (2021). Degradation of phenolic compounds found in olive products by *Lactobacillus plantarum* strains. *Olives and Olive Oil in Health and Disease Prevention*, 133–144. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-819528-4.00028-6>
- Lefeber, T., Janssens, M., Camu, N., & De Vuyst, L. (2010). Kinetic Analysis of Strains of Lactic Acid Bacteria and Acetic Acid Bacteria in Cocoa Pulp Simulation Media toward Development of a Starter Culture for Cocoa Bean Fermentation. *Applied and Environmental Microbiology*, 76(23), 7708–7716. <https://doi.org/10.1128/aem.01206-10>
- Lopes, G. G., Morgano, M. A., & Taniwaki, M. H. (2024). Advances in bean-to-bar chocolate production: Microbiology, biochemistry, processing, and sensorial aspects. *Brazilian Journal of Food Technology*, 27. <https://doi.org/10.1590/1981-6723.13323>
- López Hernández, M. del P., Criollo Núñez, J., Hernández Gómez, M. S., & Lozano Tovar, M. D. (2019). Physicochemical and microbiological dynamics of the fermentation of the CCN51 cocoa material in three maturity stages. *Revista Brasileira de Fruticultura*, 41(3), e-010. <https://doi.org/10.1590/0100-29452019010>
- Macedo, A. S. L., Rocha, F. de S., Ribeiro, M. da S., Soares, S. E., & Bispo, E. da S. (2016). Characterization of polyphenol oxidase in two cocoa (*Theobroma cacao* L.) cultivars

- produced in the south of Bahia, Brazil. *Food Science and Technology*, 36(1), 56–63. <https://doi.org/10.1590/1678-457X.0009>
- Mira, P., Yeh, P., & Hall, B. G. (2022). Estimating microbial population data from optical density. *PLOS ONE*, 17(10), e0276040. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0276040>
- Misnawi, Selamat, J., Bakar, J., y Saari, N. (2002). Oxidation of polyphenols in unfermented and partly fermented cocoa beans by cocoa polyphenol oxidase and tyrosinase. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 82(5), 559–566. <https://doi.org/10.1002/jsfa.1075>
- Morales-Rodriguez, W., Morante-Carriel, J., Herrera-Feijoo, R., Ayuso-Yuste, M., & Bernalte-García, M. (2024). Effect of addition of yeasts and enzymes during fermentation on physicochemical quality of fine aroma cocoa beans. *Journal of Agriculture and Food Research*, 15, 101037. <https://doi.org/10.1016/j.jafr.2024.101037>
- Mota-Gutierrez, J., Botta, C., Ferrocino, I., Giordano, M., Bertolino, M., Dolci, P., Cannoni, M., & Cocolin, L. (2018). Dynamics and Biodiversity of Bacterial and Yeast Communities during Fermentation of Cocoa Beans. *Applied and Environmental Microbiology*, 84(19). <https://doi.org/10.1128/AEM.01164-18>
- 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>
- International Cocoa Organization. (2025). Statistics. *International Cocoa Organization*. <https://www.icco.org/statistics/>
- Opalek, M., Wloch-Salamon, D., & Smug, B. J. (2025). Assessing methods for estimating microbial lag phase duration: a comparative analysis using *Saccharomyces cerevisiae* empirical and simulated data. *FEMS Yeast Research*, 25. <https://doi.org/10.1093/femsyr/foaf033>
- Ozturk, G., & Young, G. M. (2017). Food Evolution: The Impact of Society and Science on the Fermentation of Cocoa Beans. *Comprehensive reviews in food science and food safety*, 16(3), 431–455. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12264>
- Papalexandratou, Z., Falony, G., Romanens, E., Jimenez, J. C., Amores, F., Daniel, H. M., & De Vuyst, L. (2011). Species diversity, community dynamics, and metabolite kinetics of the microbiota associated with traditional ecuadorian spontaneous cocoa bean fermentations. *Applied and environmental microbiology*, 77(21), 7698–7714. <https://doi.org/10.1128/AEM.05523-11>
- 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>
- Putri, D. N., De Steur, H., Juvinal, J. G., Gellynck, X., & Schouteten, J. J. (2024). Sensory attributes of fine flavor cocoa beans and chocolate: A systematic literature review. *Journal of Food Science*, 89, 1917–1943. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.17006>
- Quiroz, J. (2012). Influencia de la agronomía y cosecha sobre la calidad del cacao. *Instituto Nacional Autónomo de Investigaciones Agropecuarias*. <https://repositorio.iniap.gob.ec/items/18453bdf-2e12-412f-a9b1-06619440e4db>

- Ruiz-Santiago, F. L., Márquez-Rocha, F. J., García-Alamilla, P., Carrera-Lanestosa, A., Ramírez-López, C., Ocaranza-Sánchez, E., & Jiménez-Rodríguez, D. J. (2024). Physicochemical and Biochemical Changes in Cocoa during the Fermentation Step. *Fermentation*, *10*(8), 405. <https://doi.org/10.3390/fermentation10080405>
- Salinas, W., Kampe, B., Aponte, P. M., Vargas, P., Ciobota, V., Rösch, P., Popp, J., & Ramos, L. A. (2016). Distinction of Ecuadorian varieties of fermented cocoa beans using Raman spectroscopy. *Food Chemistry*, *211*, 274-280. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.05.017>
- Schwan, R. F. (1998). Cocoa Fermentations Conducted with a Defined Microbial Cocktail Inoculum. *Applied and Environmental Microbiology*, *64*(4), 1477-1483. <https://doi.org/10.1128/AEM.64.4.1477-1483.1998>
- Schwan, R. F., & Wheals, A. E. (2004). The Microbiology of Cocoa Fermentation and its Role in Chocolate Quality. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, *44*(4), 205-221. <https://doi.org/10.1080/10408690490464104>
- Servicio Ecuatoriano de Normalización (INEN). (2021). *Granos de cacao. Requisitos* (NTE INEN 176; 6.^a rev.).
- Streule, S., Freimüller Leischtfeld, S., Galler, M., Motzer, D., Poulouse-Züst, M., & Miescher Schwenninger, S. (2023). Variations in Ecuadorian Cocoa Fermentation and Drying at Two Locations: Implications for Quality and Sensory. *Foods*, *13*(1), 137. <https://doi.org/10.3390/foods13010137>
- Tsaaqifah, H., Fahrurrozi, F., & Meryandini, A. (2023). Selection Of Lactic Acid Bacteria as Starter Culture for Cocoa Fermentation (*Theobroma Cacao L.*). *Jurnal Penelitian Pendidikan IPA*, *9*(2), 825-831. <https://doi.org/10.29303/jppipa.v9i2.3045>
- Vicepresidencia del Ecuador. (2015). Diagnóstico de la cadena productiva del cacao en el Ecuador. <https://www.vicepresidencia.gob.ec/wp-content/uploads/2015/07/Resumen-Cadena-de-Cacao-rev.pdf>
- Viesser, J. A., de Melo Pereira, G. V., de Carvalho Neto, D. P., Favero, G. R., de Carvalho, J. C., Goés-Neto, A., Rogez, H., & Soccol, C. R. (2021). Global cocoa fermentation microbiome: revealing new taxa and microbial functions by next generation sequencing technologies. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, *37*(7). <https://doi.org/10.1007/s11274-021-03079-2>
- Vizcaino-Almeida, C. R., Guajardo-Flores, D., Caroca-Cáceres, R., Serna-Saldívar, S. O., Briones-García, M., & Lazo-Vélez, M. A. (2022). Non-conventional fermentation at laboratory scale of cocoa beans: using probiotic microorganisms and substitution of mucilage by fruit pulps. *International Journal of Food Science & Technology*, *57*(7), 4307-4315. <https://doi.org/10.1111/ijfs.15757>
- Wang, N., Zhang, P., Zhou, X., Zheng, J., Ma, Y., Liu, C., Wu, T., Li, H., Wang, X., Wang, H., Zhao, X., Mehmood, M. A., & Zhu, H. (2023). Isolation, Identification, and Characterization of an Acid-Tolerant *Pichia kudriavzevii* and Exploration of Its Acetic Acid Tolerance Mechanism. *Fermentation*, *9*(6), 540. <https://doi.org/10.3390/fermentation9060540>
- Yates, G. T., & Smotzer, T. (2007). On the lag phase and initial decline of microbial growth curves. *Journal of Theoretical Biology*, *244*(3), 511-517. <https://doi.org/10.1016/j.jtbi.2006.08.017>

7 Anexos

Anexo A. Concentración de los cultivos iniciadores empleados en la fermentación

Experimento	Microorganismo	x 10 ⁵ UFC/g			
		0h	24h	48h	72h
TM	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	15,6 ± 0,48	-	-	-
	<i>Pichia kudriavzevii</i>	9,15 ± 0,29	-	-	-
	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i>	15,1 ± 0,48	-	-	-
	<i>Acetobacter ghanensis</i>	27,2 ± 5,32	-	-	-
BAL24	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	15,6 ± 0,48	-	-	-
	<i>Pichia kudriavzevii</i>	9,15 ± 0,29	-	-	-
	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i>	-	23,1 ± 7,15	-	-
	<i>Acetobacter ghanensis</i>	-	-	14,2 ± 5,18	-
BAA48	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	15,6 ± 0,48	-	-	-
	<i>Pichia kudriavzevii</i>	9,15 ± 0,29	-	-	-
	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i>	15,1 ± 0,48	-	-	-
	<i>Acetobacter ghanensis</i>	-	-	-	11,9 ± 1,66

Anexo B. Fotografías del proceso fermentativo



Figura B.1. Preparación del cacao para la fermentación.



Figura B.2. Adición de pulpa de frutas (maracuyá y banano).



Figura B.3. Muestras de cacao en fermentador.



Figura B.4. Proceso de secado.

Anexo C. Análisis de prueba de corte

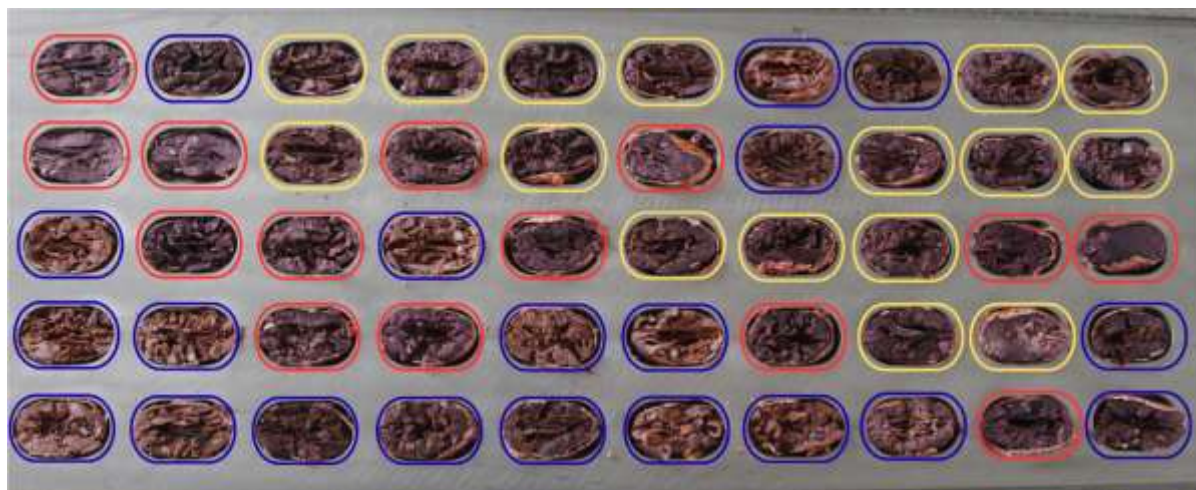


Figura C.1. Prueba de corte del tratamiento BAA48 (réplica 1). El color azul hace referencia a granos fermentados, color amarillo a granos parcialmente fermentados y color rojo a granos violetas

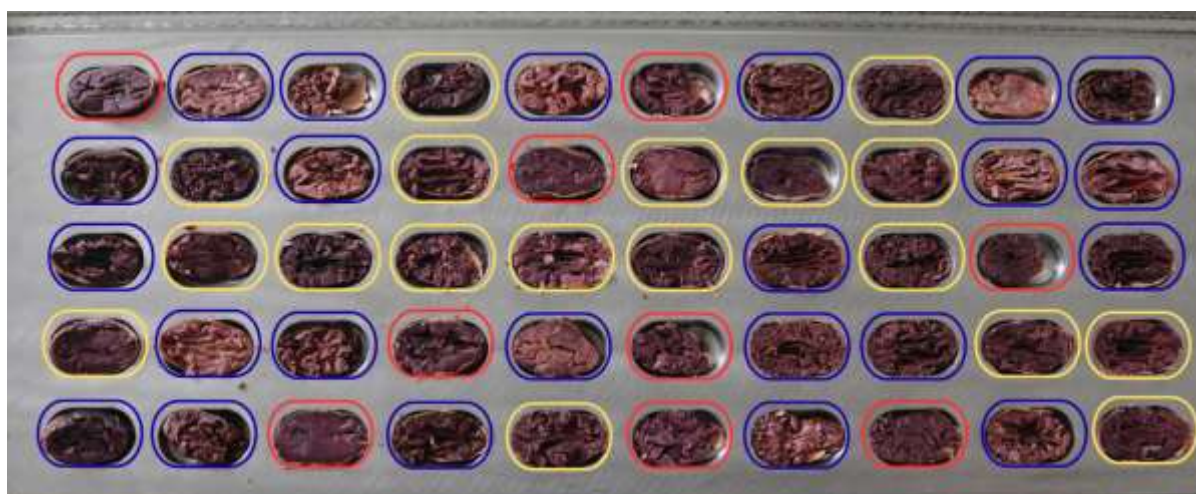


Figura C.2. Prueba de corte del tratamiento ESC (réplica 1). El color azul hace referencia a granos fermentados, color amarillo a granos parcialmente fermentados y color rojo a granos violetas

Anexo D. Resultados de la fermentación según la prueba de corte

Muestra	% fermentados	% parcialmente fermentados	% no fermentados	Score
BAA48.1	40	32	28	560
BAA48.2	42	34	24	590

BAL24.1	22	36	42	400
BAL24.2	26	40	34	460
EPF1	34	36	30	520
EPF2	22	50	28	470
ESC1	46	36	18	640
ESC2	24	48	28	480
TM1	26	38	36	450
TM2	38	36	26	560

Nota: Porcentajes de fermentación obtenidos para cada réplica biológica de los tratamientos, junto con su puntuación final, siguiendo el método descrito por Hernández-Hernández et al. (2016).

Anexo E. Índice de fermentación

Tratamiento	96 horas	120 horas	144 horas
ESC	0.544±0.053 ^A	0.919±0.089 ^A	0.923±0.187 ^A
EPF	0.479±0.061 ^A	0.606±0.046 ^B	0.899±0.189 ^A
TM	0.456±0.038 ^A	0.612±0.029 ^B	0.822±0.023 ^A
BAL24	0.566±0.017 ^A	0.728±0.019 ^{AB}	0.762±0.103 ^A
BAA48	0.507±0.005 ^A	0.657±0.100 ^{AB}	0.874±0.121 ^A

Nota: Valor promedio ± Desviación estándar (n=18), letra diferente en la misma columna indica diferencias significativas (test t, alfa=0.05).