

**EVALUACIÓN DE MEZCLAS DE MICROORGANISMOS PROMOTORES DE LA
FERMENTACIÓN PARA MEJORAR LA CALIDAD DEL GRANO DE CACAO**

JORGE DANIEL FONSECA BLANCO

**UNIVERSIDAD POPULAR DEL CESAR
FACULTAD DE INGENIERÍAS Y TECNOLÓGICAS
PROGRAMA DE INGENIERÍA AGROINDUSTRIAL
VALLEDUPAR-CESAR**

2019

**EVALUACIÓN DE MEZCLAS DE MICROORGANISMOS PROMOTORES DE LA
FERMENTACIÓN PARA MEJORAR LA CALIDAD DEL GRANO DE CACAO**

JORGE DANIEL FONSECA BLANCO

**Trabajo de grado presentado como requisito parcial para optar al título de
Ingeniero Agroindustrial**

Directora

MARÍA DENIS LOZANO TOVAR

PhD. Ciencias Agrarias, Agroalimentarias y de los Recursos Naturales

Codirector

RICARDO DURÁN BARÓN

PhD. Ingeniería

**UNIVERSIDAD POPULAR DEL CESAR
FACULTAD DE INGENIERÍAS Y TECNOLÓGICAS
PROGRAMA DE INGENIERÍA AGROINDUSTRIAL
VALLEDUPAR-CESAR**

2019

PROYECTO DE GRADO

TÍTULO: EVALUACIÓN DE MEZCLAS DE MICROORGANISMOS PROMOTORES DE LA FERMENTACIÓN PARA MEJORAR LA CALIDAD DEL GRANO DE CACAO.

PRESENTADO ANTE: COMITÉ DE PROYECTO DE GRADO

DEPARTAMENTO: INGENIERÍA AGROINDUSTRIAL

ELABORADO POR: JORGE DANIEL FONSECA BLANCO

DIRECTORA: MARÍA DENIS LOZANO TOVAR

FIRMA:



CODIRECTOR: RICARDO DURÁN BARÓN

FIRMA:

ESTUDIANTE: JORGE DANIEL FONSECA BLANCO

FIRMA:

Nota de aceptación:

Firma del presidente del jurado

Firma del jurado

Firma del jurado

Dedicada a:

Mi madre

Mi Hermano

AGRADECIMIENTOS

A Dios por bendecir mi vida y por darme la sabiduría y la fortaleza para salir adelante.

A la Dra. María Denis Lozano por su apoyo, orientación y enseñanza. Muchas gracias por haberme dado la oportunidad de tener esta experiencia como investigador. En verdad que aprendí mucho de usted.

Al Dr. Ricardo Duran por su confianza, consejos y apoyo durante el desarrollo de este trabajo.

A mis compañeros de laboratorio Carlos, Karen, Jose, Martha y Paola por su valiosa colaboración y apoyo durante toda la investigación.

A la Sra. Ana Gladys por su apoyo incondicional.

A la Ingeniera Jenifer Criollo por su asesoría en la parte experimental.

A los miembros del panel sensorial del Centro de Investigación Nataima, por su importante trabajo.

A Heidi y Jhon Freddy por su amistad y apoyo.

A todos los profesionales de apoyo del Centro de Investigación Nataima, por compartir experiencias y conocimientos para el desarrollo de este trabajo.

A mis padres y hermano por su amor, confianza y apoyo incondicional.

A mi familia por su apoyo irrestricto.

A mis amigos Deiber e Iván por su apoyo y amistad.

A la Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria – Agrosavia, por haber financiado esta tesis y por haberme permitido hacer parte de esta prestigiosa organización.

A la Universidad Popular del Cesar, en especial a los profesores del programa de Ingeniería agroindustrial por sus conocimientos y enseñanzas.

RESUMEN

La fermentación del cacao (*Theobroma cacao* L.) es una etapa fundamental del proceso de poscosecha, ya que aquí se desarrollan los precursores del sabor a chocolate. En Colombia, se han identificado falencias en los procesos de fermentación del grano en la totalidad de regiones productoras de cacao, debido a que se realiza de manera espontánea, tradicional e incontrolada. Dando como resultado productos de calidad variable. Ante esta situación, se propuso la utilización de mezclas de microorganismos promotores de la fermentación para mejorar y estandarizar la calidad del grano de cacao. Dos levaduras (Lev) (*Wickerhamomyces anomalus* y *Debaryomyces hansenii*), tres bacterias ácido lácticas (BAL) (*Pediococcus acidilactici*, *Lactobacillus brevis* y *Lactobacillus plantarum*) y tres bacterias ácido acéticas (BAA) (*Gluconobacter japonicus*, *Acetobacter tropicalis* y *Acetobacter pasteurianus*) obtenidas de la fermentación de cacao fueron seleccionadas por su capacidad de producción de pectinasas y ácido. A través de la técnica de microfermentación, se evaluaron diferentes proporciones de los microorganismos en el cultivo iniciador (1:1:1, 1:2:2, 1:2:1, 1:1:2, 2:1:1, 2:2:1, 2:1:2, 2:2:2, Lev: BAL: BAA) con una dosis de 1% v/p. La fermentación se realizó durante 7 días y las variables evaluadas fueron pH, acidez total, índice de fermentación, prueba de corte y análisis sensorial. La mejor mezcla fue evaluada a nivel de campo en macrofermentación. Se utilizó un diseño completamente al azar y prueba de Tukey a un nivel de confianza del 95%. La mezcla (2:1:2) presentó el mejor perfil sensorial, sobresaliendo por sus notas altas de sabor a cacao, panela malta, frutal y nuez, con baja astringencia y amargo y buena acidez. Los resultados a nivel de campo mostraron que la mezcla (2:1:2) aceleró el proceso de acidificación del grano de cacao. La prueba de corte mostró mayor porcentaje de granos bien fermentados (63.33%) en la mezcla (2:1:2) frente al control (30%). El análisis sensorial evidenció que la adición de microorganismos ayudó a disminuir la acidez, la astringencia y el amargor e intensificó el sabor a cacao y nuez.

Palabra clave: cacao, fermentación de cacao, cultivo iniciador, calidad.

CONTENIDO

	pág.
1. TÍTULO	25
2. INTRODUCCIÓN	26
3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	27
4. JUSTIFICACIÓN	29
5. OBJETIVOS	31
5.1. OBJETIVO GENERAL	31
5.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	31
6. MARCO DE REFERENCIA	32
6.1. ESTADO DEL ARTE	32
6.2. MARCO TEÓRICO	35
6.2.1. Generalidades del cacao	35
6.2.2. Variedades de cacao	36
6.2.3. Beneficio del cacao	40
6.2.4. Fermentación del grano de cacao	40
6.2.5. Métodos de fermentación	41
6.2.6. La microbiología de la fermentación de los granos de cacao	45
6.2.7. Secado	49
6.2.8. Calidad del grano de cacao	50
6.2.9. Calidad física del grano de cacao	51
6.2.10. Calidad sensorial del grano de cacao	52
7. MATERIALES Y MÉTODOS	53
7.1. LOCALIZACIÓN	53
7.2. MATERIAL VEGETAL	53
7.3. MATERIAL BIOLÓGICO	54
7.4. SELECCIÓN DE LEVADURAS POR SU CAPACIDAD DE PRODUCCIÓN DE PECTINASAS	56
7.4.1. Preparación de medios de cultivos	56
7.4.2. Activación del microorganismo	56

	pág.
7.4.3. Evaluación de la producción de pectinasas	57
7.5. SELECCIÓN DE AISLADOS DE BACTERIAS ÁCIDO LÁCTICAS (BAL) POR SU PRODUCCIÓN DE ÁCIDO LÁCTICO	57
7.5.1. Preparación del medio de cultivo	57
7.5.2. Activación del microorganismo	57
7.5.3. Evaluación de la producción de ácido láctico	57
7.6. SELECCIÓN DE AISLADOS DE BACTERIAS ÁCIDO ACÉTICAS (BAA) POR SU PRODUCCIÓN DE ÁCIDO ACÉTICO.	58
7.6.1. Preparación del medio de cultivo	58
7.6.2. Activación del microorganismo	59
7.6.3. Siembra del microorganismo	59
7.6.4. Evaluación de la producción de ácido acético	59
7.7. OPTIMIZACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE PECTINASAS POR <i>Aureobasidium pullulans</i> AISLADA DE LA FILOSFERA DEL CACAO	60
7.7.1. Preparación del medio de cultivo	60
7.7.2. Siembra del microorganismo	60
7.7.3. Obtención del extracto enzimático	60
7.7.4. Determinación de proteínas	61
7.7.5. Determinación de la concentración de pectinasas	61
7.7.6. Determinación de la actividad de poligalacturonasa (PG) por el método del ácido dinitrosalicílico (DNS)	62
7.8. EVALUACIÓN DE MEZCLAS DE MICROORGANISMOS POTENCIALES PARA LA FERMENTACIÓN	62
7.8.1. Producción del inóculo	62
7.8.2. Microfermentación	65
7.8.3. Secado	66
7.8.4. Variables fisicoquímicas	66
7.8.5. Elaboración del licor del cacao	67
7.8.6. Evaluación sensorial	67
7.9. PRUEBA A NIVEL DE CAMPO	68
7.10. DISEÑO EXPERIMENTAL Y ANÁLISIS ESTADÍSTICO	70

	pág.
8. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	71
8.1. SELECCIÓN DE LEVADURAS POR SU ACTIVIDAD PECTINOLÍTICA	71
8.2. SELECCIÓN DE BACTERIAS ÁCIDO LÁCTICAS (BAL) POR SU CAPACIDAD DE PRODUCCIÓN DE ÁCIDO	77
8.3. SELECCIÓN DE BACTERIAS ÁCIDO ACÉTICAS (BAA) POR SU CAPACIDAD DE PRODUCCIÓN DE ÁCIDO.	82
8.4. OPTIMIZACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE PECTINASAS POR <i>Aureobasidium pulullans</i> AISLADO DE LA FILOSFERA DE CACAO	84
8.4.1. Producción de biomasa	84
8.4.2. Concentración de pectinasas	86
8.4.3. Contenido de proteína	87
8.4.4. Actividad de poligacturonasa (PG)	88
8.5. EVALUACIÓN DE MEZCLAS DE MICROORGANISMOS SOBRE LAS CARACTERÍSTICAS FISCOQUÍMICAS Y SENSORIALES DEL GRANO DE CACAO	89
8.5.1. Cambios en el pH del grano de cacao durante la microfermentación por el efecto de diferentes mezclas microorganismos	89
8.5.2. Cambios en la acidez total del grano de cacao durante la microfermentación por el efecto de diferentes mezclas de microorganismos	91
8.5.3. Cambios en el índice de fermentación del grano de cacao durante la microfermentacion por el efecto de diferentes mezclas de microorganismos	93
8.5.4. Cambios en la prueba de corte durante la microfermentación por el efecto de diferentes mezclas de microorganismos	94
8.5.5. Análisis sensorial de la microfermentación	95
8.6. EVALUACIÓN DE UNA MEZCLA DE MICROORGANISMOS A ESCALA PILOTO SOBRE LA CALIDAD DEL GRANO DE CACAO	100
8.6.1. Cambios en el pH del grano de cacao durante la macrofermentación por el efecto de mezcla de microorganismos	100

	pág.
8.6.2. Cambios en la acidez total del grano de cacao durante la macrofermentación por el efecto de mezcla de microorganismos	102
8.6.3. Cambios en el índice de fermentación del grano de cacao durante la macrofermentación por el efecto de mezcla de microorganismos	104
8.6.4. Cambios en la prueba de corte durante la fermentación del grano de cacao por el efecto de mezcla de microorganismos	107
8.6.5. Análisis sensorial de la macrofermentación	108
9. CONCLUSIONES	110
10. RECOMENDACIONES	112
11. BIBLIOGRAFÍA	113
12. ANEXOS	128

LISTA DE TABLAS

	pág.
Tabla 1. Requisitos del grano de cacao NTC 1252	51
Tabla 2. Especies de levaduras aisladas de la filosfera y fermentación del cacao en tres regiones de Colombia	54
Tabla 3. Especies de bacterias ácido lácticas (BAL) aisladas de la fermentación de cacao en tres regiones de Colombia	55
Tabla 4. Especies de bacterias ácido acéticas (BAA) aisladas de la fermentación de cacao en tres regiones de Colombia	56
Tabla 5. Mezclas de microorganismos evaluadas sobre la calidad del grano de cacao	64
Tabla 6. Escala con criterios de evaluación del árbitro sensorial	68

LISTA DE FIGURAS

	pág.
Figura 1. Fruto de cacao Criollo	37
Figura 2. Fruto de cacao Forastero	38
Figura 3. Fruto de cacao Trinitario	39
Figura 4. Fruto de cacao Nacional	39
Figura 5. a) Montón en construcción; los granos se colocan en hojas de plátano. b) Montón cubierto con hojas de plátano	42
Figura 6. Fermentación en cajón sencillo	43
Figura 7. Fermentación en plataforma de secado	44
Figura 8. Fermentación en bandejas	44
Figura 9. Fermentación en canastas	45
Figura 10. Dinámica microbiana. a) Cinética de degradación del sustrato y producción de metabolitos; b)	49
Figura 11. Métodos de secado; Secado natural a); Secado artificial b)	50
Figura 12. Ubicación geográfica de recolección de frutos de cacao	53
Figura 13. Microfermentación de granos de cacao en tarrinas plásticas incubadas a 35°C durante la fase anaeróbica	65
Figura 14. Secado de cacao. a) granos de cacao después de 24 h de fermentación; b) granos de cacao después de 120 h de fermentación	66
Figura 15. Fermentación de granos de cacao en cajón de madera	69
Figura 16. Evaluación de la actividad pectinolítica por levaduras obtenidas de la fermentación de cacao en medio sólido de agar pulpa de cacao (APC) y pectina	71
Figura 17. Evaluación de la actividad pectinolítica por aislados de levadura obtenidos de la filosfera de cacao en medio sólido de agar pulpa de cacao (APC) y pectina	72
Figura 18. Formación de halos claros alrededor de las colonias de <i>Aureobasidium pullulans</i> en medio de pectina cítrica	73

	pág.
Figura 19. Evaluación de la producción de ácido por bacterias ácido lácticas (BAL) obtenidas de la fermentación de cacao	78
Figura 20. Evaluación de la producción de biomasa (g/L) por bacterias ácido lácticas (BAL) obtenidas de la fermentación de cacao	79
Figura 21. Evaluación de producción de ácido por bacterias ácido acéticas (BAA) obtenidas de la fermentación de cacao	82
Figura 22. Evaluación de producción de biomasa por bacterias ácido acéticas (BAA) obtenidas de la fermentación de cacao	83
Figura 23. Efecto del pH y tiempo de fermentación (h) en la producción de biomasa por <i>A. pullulans</i>	85
Figura 24. Efecto del pH y tiempo de fermentación (h) en la concentración de pectinasas (mg/mL)	86
Figura 25. Efecto del pH y tiempo de fermentación (h) en el contenido de proteína (µg/mL) en el medio de fermentación	87
Figura 26. Efecto del pH y tiempo de fermentación (h) en la actividad de poligalacturonasa (PG) de <i>A. pullulans</i>	88
Figura 27. Cambios en el pH del grano de cacao durante la microfermentación por el efecto de diferentes mezclas de microorganismos	90
Figura 28. Cambios en el porcentaje de acidez del grano de cacao durante la microfermentación por el efecto de diferentes mezclas de microorganismos	92
Figura 29. Cambios en el índice de fermentación del grano de cacao por el efecto de diferentes mezclas de microorganismos	93
Figura 30. Cambios en la prueba de corte durante la microfermentación por el efecto de diferentes mezclas de microorganismos	95
Figura 31. Perfiles sensoriales del cacao proveniente de diferentes mezclas de microorganismos	98
Figura 32. Cambios en el pH del grano de cacao durante la fermentación por el efecto de mezcla de microorganismos	101
Figura 33. Cambios en la acidez total del grano de cacao durante la macrofermentación por el efecto de mezcla de microorganismos	104

	pág.
Figura 34. Cambios en el índice de fermentación del grano de cacao durante la macrofermentación por el efecto de mezcla de microorganismos	106
Figura 35. Cambios en la prueba de corte de los granos de cacao durante la macrofermentación por el efecto de mezcla de microorganismos	107
Figura 36. Perfiles sensoriales de licores de cacao derivados de fermentación inoculada y sin inocular (Control)	108

LISTA DE ECUACIONES

	pág.
Ecuación 1. Producción de ácido láctico.	58
Ecuación 2. Producción de ácido acético.	59
Ecuación 3. Porcentaje de granos bien fermentados.	67

LISTA DE ANEXOS

	pág.
Anexo 1. Media y desviación estándar del diámetro (mm) de colonias de aislados de levaduras de la fermentación de cacao en medio sólido de agar pulpa de cacao (APC) y Pectina	128
Anexo 2. Prueba de Kolmogorov-Smirnov aplicada a diámetro (mm) de colonias de levaduras aisladas de la fermentación de cacao	128
Anexo 3. Prueba de Levene aplicada a diámetro de colonias de levaduras aisladas de la fermentación de cacao	128
Anexo 4. Prueba de Kruskal-Wallis aplicada a diámetro de colonias de levaduras aisladas de la fermentación de cacao	129
Anexo 5. Comparación de aislados de levaduras de la fermentación de cacao en medio APC	129
Anexo 6. Comparación de aislados de levaduras de la fermentación de cacao en medio de pectina	130
Anexo 7. Media y desviación estándar de diámetro (mm) de colonias de aislados de levaduras de la filosfera de cacao en medio sólido de agar pulpa de cacao (APC) y pectina	130
Anexo 8. Prueba de Kolmogorov-Smirnov aplicada a diámetro (mm) de colonias de levaduras aisladas de la filosfera de cacao	131
Anexo 9. Prueba de Levene aplicada a diámetro (mm) de colonias de levaduras aisladas de la filosfera de cacao	131
Anexo 10. Prueba de Kruskal-Wallis aplicada a diámetro (mm) de colonias de levaduras aisladas de la filosfera de cacao	131
Anexo 11. Comparación de levaduras de la filosfera de cacao en medio APC	131
Anexo 12. Comparación de aislados de levaduras de la filosfera de cacao en medio de pectina	132
Anexo 13. Diámetro de halo alrededor de colonia de <i>Aureobasidium pullulans</i>	132
Anexo 14. Media y desviación estándar de producción de ácido láctico (%p/v) y biomasa (g/L) por bacterias ácido lácticas (BAL) obtenidas de la fermentación de cacao	133

	pág.
Anexo 15. Prueba de Kolmogorov-Smirnov aplicada a producción de ácido láctico (%p/v) y biomasa (g/L) por bacterias ácido lácticas (BAL) obtenidas de la fermentación de cacao	133
Anexo 16. Prueba de Levene aplicada a producción de ácido láctico (%p/v) y biomasa (g/L) por bacterias ácido lácticas (BAL) obtenidas de la fermentación de cacao	133
Anexo 17. Prueba de Krukal-Wallis aplicada a producción de ácido láctico (%p/v) y biomasa (g/L) por bacterias ácido lácticas (BAL) obtenidas de la fermentación de cacao	134
Anexo 18. Comparación de producción de ácido láctico (%p/v) por bacterias ácido lácticas (BAL) obtenidas de la fermentación de cacao	134
Anexo 19. Comparación de biomasa (g/L) de bacterias ácido lácticas (BAL) obtenidas de la fermentación de cacao	135
Anexo 20. Media y desviación estándar de producción de ácido acético (%p/v) y biomasa (g/L) por bacterias ácido acéticas obtenidas de la fermentación de cacao	135
Anexo 21. Prueba de Shapiro-Wilks aplicada a producción de ácido acético (%p/v) y biomasa (g/L) por bacterias ácido acéticas (BAA) obtenidas de la fermentación de cacao	135
Anexo 22. Prueba de Levene aplicada a producción de ácido acético (%p/v) y biomasa (g/L) por bacterias ácido acéticas (BAA) obtenidas de la fermentación de cacao	136
Anexo 23. Prueba de Kruskal-Wallis aplicada a producción de ácido acético (%p/v) y biomasa (g/L) por bacterias ácido acéticas (BAA) obtenidas de la fermentación de cacao	136
Anexo 24. Comparación de biomasa (g/L) por bacterias ácido acéticas (BAA) obtenidas de la fermentación de cacao	136
Anexo 25. Media y desviación estándar de biomasa (g/L) de <i>Aureobasidium pullulans</i>	137
Anexo 26. Prueba de normalidad para biomasa (g/L) del <i>Aureobasidium pullulans</i>	137
Anexo 27. Verificación de varianza para biomasa (g/L) de <i>Aureobasidium pullulans</i>	137

	pág.
Anexo 28. Análisis de varianza para biomasa (g/L) de <i>Aureobasidium pullulans</i>	137
Anexo 29. Prueba de Tukey para biomasa (g/L) de <i>Aureobasidium pullulans</i>	138
Anexo 30. Media y desviación estándar de concentración (mg/mL) de pectinasas	138
Anexo 31. Prueba de normalidad para concentración (mg/mL) de pectinasas	139
Anexo 32. Verificación de varianza para concentración (mg/mL) de pectinasas	139
Anexo 33. Análisis de varianza para concentración (mg/mL) de pectinasas	139
Anexo 34. Prueba de Tukey para concentración (mg/mL) de pectinasas	139
Anexo 35. Media y desviación estándar de proteína (µg/mL)	140
Anexo 36. Prueba de normalidad para proteína (µg/mL)	140
Anexo 37. Verificación de varianza para proteína (µg/mL)	140
Anexo 38. Análisis de varianza para proteína (µg/mL)	140
Anexo 39. Prueba de Tukey para proteína (µg/mL)	141
Anexo 40. Media y desviación estándar de actividad de poligalacturonasa (U/mL)	141
Anexo 41. Prueba de normalidad para actividad de poligalacturonasa (U/mL)	142
Anexo 42. Verificación de varianza para actividad de poligalacturonasa (U/mL)	142
Anexo 43. Análisis de varianza para actividad de poligalacturonasa (U/mL)	142
Anexo 44. Prueba de Tukey para actividad de poligalacturonasa (U/mL)	142
Anexo 45. Datos de los perfiles sensoriales de los licores de cacao de las diferentes mezclas de microorganismos en el día 7 de la microfermentación	143
Anexo 46. Prueba de normalidad para pH en el día 1 de la macrofermentación	143
Anexo 47. Verificación de varianza para pH en el día 1 de la macrofermentación	143
Anexo 48. Análisis de varianza para pH en el día 1 de la macrofermentación	143

	pág.
Anexo 49. Prueba de Tukey para pH en el día 1 de la macrofermentación	143
Anexo 50. Prueba de normalidad para pH en el día 2 de la macrofermentación	144
Anexo 51. Verificación de varianza para pH en el día 2 de la macrofermentación	144
Anexo 52. Análisis de varianza para pH en el día 2 de la macrofermentación	144
Anexo 53. Prueba de Tukey para pH en el día 2 de la macrofermentación	144
Anexo 54. Prueba de normalidad para pH en el día 3 de la macrofermentación	144
Anexo 55. Verificación de varianza para pH en el día 3 de la macrofermentación	144
Anexo 56. Análisis de varianza para pH en el día 3 de la macrofermentación	144
Anexo 57. Prueba de Tukey para pH en el día 3 de la macrofermentación	145
Anexo 58. Prueba de normalidad para pH en el día 4 de la macrofermentación	145
Anexo 59. Verificación de varianza para pH en el día 4 de la macrofermentación	145
Anexo 60. Análisis de varianza para pH en el día 4 de la macrofermentación	145
Anexo 61. Prueba de Tukey para pH en el día 4 de la macrofermentación	145
Anexo 62. Prueba de normalidad para pH en el día 5 de la macrofermentación	145
Anexo 63. Verificación de varianza para pH en el día 5 de la macrofermentación	146
Anexo 64. Análisis de varianza para pH en el día 5 de la macrofermentación	146
Anexo 65. Prueba de Tukey para pH en el día 5 de la macrofermentación	146
Anexo 66. Prueba de normalidad para pH en el día 6 de la macrofermentación	146
Anexo 67. Verificación de varianza para pH en el día 6 de la macrofermentación	146
Anexo 68. Análisis de varianza para pH en el día 6 de la macrofermentación	146
Anexo 69. Prueba de Tukey para pH en el día 6 de la macrofermentación	147

	pág.
Anexo 70. Prueba de normalidad para pH en el día 7 de la macrofermentación	147
Anexo 71. Verificación de varianza para pH en el día 7 de la macrofermentación	147
Anexo 72. Análisis de varianza para pH en el día 7 de la macrofermentación	147
Anexo 73. Prueba de Tukey para pH en el día 7 de la macrofermentación	147
Anexo 74. Prueba de normalidad para acidez total en el día 1 de la macrofermentación	147
Anexo 75. Verificación de varianza para acidez total en el día 1 de la macrofermentación	148
Anexo 76. Análisis de varianza para acidez total en el día 1 de la macrofermentación	148
Anexo 77. Prueba de Tukey para acidez total en el día 1 de la macrofermentación	148
Anexo 78. Prueba de normalidad para acidez total en el día 2 de la macrofermentación	148
Anexo 79. Verificación de varianza para acidez total en el día 2 de la macrofermentación	148
Anexo 80. Análisis de varianza para acidez total en el día 2 de la macrofermentación	149
Anexo 81. Prueba de Tukey para acidez total en el día 2 de la macrofermentación	149
Anexo 82. Prueba de normalidad para acidez total en el día 3 de la macrofermentación	149
Anexo 83. Verificación de varianza para acidez total en el día 3 de la macrofermentación	149
Anexo 84. Análisis de varianza para acidez total en el día 3 de la macrofermentación	149
Anexo 85. Prueba de Tukey para acidez total en el día 3 de la macrofermentación	149
Anexo 86. Prueba de normalidad para acidez total en el día 4 de la macrofermentación	150

	pág.
Anexo 87. Verificación de varianza para acidez total en el día 4 de la macrofermentación	150
Anexo 88. Análisis de varianza para acidez total en el día 4 de la macrofermentación	150
Anexo 89. Prueba de Tukey para acidez total en el día 4 de la macrofermentación	150
Anexo 90. Prueba de normalidad para acidez total en el día 5 de la macrofermentación	150
Anexo 91. Verificación de varianza para acidez total en el día 5 de la macrofermentación	150
Anexo 92. Análisis de varianza para acidez total en el día 5 de la macrofermentación	151
Anexo 93. Prueba de Tukey para acidez total en el día 5 de la macrofermentación	151
Anexo 94. Prueba de normalidad para acidez total en el día 6 de la macrofermentación	151
Anexo 95. Verificación de varianza para acidez total en el día 6 de la macrofermentación	151
Anexo 96. Análisis de varianza para acidez total en el día 6 de la macrofermentación	151
Anexo 97. Prueba de Tukey para acidez total en el día 6 de la macrofermentación	152
Anexo 98. Prueba de normalidad para acidez total en el día 7 de la macrofementación	152
Anexo 99. Verificación de varianza para acidez total en el día 1 de la macrofermentación	152
Anexo 100. Análisis de varianza para acidez total en el día 1 de la macrofermentación	152
Anexo 101. Prueba de Tukey para acidez total en el día 7 de la macrofermentación	152

	pág.
Anexo 102. Prueba de normalidad para índice de fermentación en el día 1 de la macrofermentación	152
Anexo 103. Verificación de varianza para índice de fermentación en el día 1 de la macrofermentación	153
Anexo 104. Análisis de varianza para índice de fermentación en el día 1 de la macrofermentación	153
Anexo 105. Prueba de Tukey para índice de fermentación en el día 1 de la macrofermentación	153
Anexo 106. Prueba de normalidad para índice de fermentación en el día 2 de la macrofermentación	153
Anexo 107. Verificación de varianza para índice de fermentación en el día 2 de la macrofermentación	153
Anexo 108. Análisis de varianza para índice de fermentación en el día 2 de la macrofermentación	154
Anexo 109. Prueba de Tukey para índice de fermentación en el día 2 de la macrofermentación	154
Anexo 110. Prueba de normalidad para índice de fermentación en el día 3 de la macrofermentación	154
Anexo 111. Verificación de varianza para índice de fermentación en el día de 3 de la macrofermentación	154
Anexo 112. Análisis de varianza para índice de fermentación en el día 3 de macrofermentación	154
Anexo 113. Prueba de Tukey para índice de fermentación en el día 3 de la macrofermentación	155
Anexo 114. Prueba de normalidad para índice de fermentación en el día 4 de la macrofermentación	155
Anexo 115. Verificación de varianza para índice de fermentación en el día 4 de la macrofermentación	155
Anexo 116. Análisis de varianza para índice de fermentación en el día 4 de la macrofermentación	155
Anexo 117. Prueba de Tukey para índice de fermentación en el día 4 de la macrofermentación	155

	pág.
Anexo 118. Prueba de normalidad para índice de fermentación en el día 5 de la macrofermentación	155
Anexo 119. Verificación de varianza para índice de fermentación en el día 5 de la macrofermentación	156
Anexo 120. Análisis de varianza para índice de fermentación en el día 5 de la macrofermentación	156
Anexo 121. Prueba de Tukey para índice de fermentación en el día 5 de la macrofermentación	156
Anexo 122. Prueba de normalidad par índice de fermentación en el día 6 de la macrofermentación	156
Anexo 123. Verificación de varianza para índice de fermentación en el día 6 de la macrofermentación	156
Anexo 124. Análisis de varianza para índice de fermentación en el día 6 de la macrofermentación	157
Anexo 125. Prueba de Tukey para índice de fermentación en el día 6 de la macrofermentación	157
Anexo 126. Prueba de normalidad para índice de fermentación en el día de 7 de la macrofermentación	157
Anexo 127. Verificación de varianza para índice de fermentación en el día 7 de la macrofermentación	157
Anexo 128. Análisis de varianza para índice de fermentación en el día 7 de la macrofermentación	157
Anexo 129. Prueba de Tukey para índice fermentación en el día 7 de la macrofermentación	158
Anexo 130. Valores medios del perfil sensorial de los licores de cacao de la macrofermentación por el efecto de mezcla de microorganismos	158

1. TÍTULO

EVALUACIÓN DE MEZCLAS DE MICROORGANISMOS PROMOTORES DE LA FERMENTACIÓN PARA MEJORAR LA CALIDAD DEL GRANO DE CACAO.

2. INTRODUCCIÓN

La fermentación del cacao es un paso clave en la transformación tecnológica de cacao en chocolate, porque los granos de cacao no fermentados, amargos y astringentes carecen del sabor agradable del chocolate (Ouattara et al., 2014; Pereira et al., 2012). La fermentación de los granos de cacao es, por lo tanto, la primera etapa del proceso de elaboración del chocolate, que consiste en un proceso natural de 5-7 días de fermentación microbiana de la pulpa mucilaginosa que rodea las semillas del árbol *Theobroma cacao* (Schwan & Wheals, 2004). Esto desencadena, la transformación bioquímica dentro de los granos, lo que conduce a la reducción de la amargura y la astringencia, el desarrollo de precursores de sabor como, aminoácidos libres, péptidos y azúcar (Afoakwa et al., 2011).

En Colombia, se han identificado falencias en los procesos de fermentación del grano en la totalidad de regiones productoras de cacao (Castellanos et al., 2007). Debido en un gran porcentaje al pequeño volumen que se maneja en cada una de la fincas, este aspecto hace que los campesinos manejen por separado dichos volúmenes que no permiten una fermentación adecuada generando cacaos de mala calidad que impiden ser competitivos frente a un mercado internacional (Barragan & Rey, 2004). Existe una demanda de cacao de buena calidad insatisfecha, para entrar en ese mercado es necesario transferir nuevas tecnologías a los cacaocultores colombianos, con las que pueda alcanzar niveles de calidad que lo hagan competitivo frente a productores del mundo. Por lo tanto, mejoren sus condiciones socioeconómicas y calidad de vida (Navia, 2015).

En esta investigación, se seleccionaron tres grupos de microorganismos obtenidos de la fermentación de cacao, el efecto de los mejores aislados de levaduras, bacterias ácido lácticas y bacterias ácido acéticas fue evaluado bajo diferentes proporciones sobre la calidad del grano de cacao. Para ello, se establecieron ocho mezclas de microorganismos potenciales para promover la fermentación del grano de cacao. La mejor mezcla fue posteriormente llevada pruebas a nivel de campo en macrofermentación y se determinaron parámetros fisicoquímicos y sensoriales.

3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El cacao (*Theobroma cacao* L.) es uno de los cultivos tropicales de mayor importancia, tanto en el ámbito nacional como internacional (Jaimes & Aranzazu, 2010). Además, es un producto agroalimentario que presenta una demanda mundial que ha crecido a un ritmo anual medio del 2.5% durante los últimos 50 años (Organization International Cocoa - ICCO, 2017). Con este panorama, se vislumbran nuevas oportunidades de mercado, aún más cuando Colombia cuenta con cacao que pueden ser catalogados como finos y de aroma en un 95% (ICCO, 2017). Por este motivo, es importante que el país mejore y estandarice su proceso de poscosecha para suministrar continuamente una materia prima de calidad a la industria, generando competitividad y valor agregado al sector.

El manejo poscosecha del cacao, denominado beneficio, constituye un aspecto de máxima importancia para presentar al mercado un producto de calidad. Dentro de las prácticas de poscosecha, la fermentación es la etapa más importante, porque en ella se desarrollan los precursores de sabor y aroma de los granos de cacao utilizados como materia prima básica en la industria del chocolate (Schwan & Wheals, 2004). Por el contrario, la falta de fermentación o la fermentación insuficiente dará lugar a granos violetas y pizarrosos, provocando un aumento del amargor y de la astringencia (CAOBISCO et al., 2015). La fermentación es un proceso espontáneo y complejo impulsado por una gran cantidad de microorganismos dentro de ambientes particulares de crecimiento y procesamiento (Schwan & Wheals, 2004). Una buena fermentación está gobernada por una sucesión particular de actividades microbianas tres grupos han sido caracterizados las levaduras, las bacterias ácido lácticas (BAL), bacterias ácido acéticas (BAA) y algunos géneros de *Bacillus*, las cuales son sinónimo de una buena fermentación (De Vuyst & Weckx, 2016; Lima et al., 2011)

En Colombia, la calidad del grano de cacao es deficiente por tener establecidas operaciones de cosecha y poscosecha con mínimo control de calidad, lo cual conduce a una heterogeneidad en el grado de fermentación (Contreras, 2017), ya que cada agricultor realiza el proceso de beneficio del cacao según la tradición le ha

enseñado, esto aunado al desconocimiento de las demandas del mercado en particular (Sánchez et al., 2008). Así mismo, se ha identificado que el manejo poscosecha de los granos de cacao en las fincas productoras, posee cierto letargo tecnológico, por la baja tecnificación y desarrollo de estándares de beneficio del grano del cacao (Castellanos et al., 2007).

En la actualidad, la demanda de los granos de cacao de alta calidad son de especial interés, puesto que las nuevas tendencias de consumo requieren chocolates con características únicas y efectos benéficos para la salud (Papalexandratou et al., 2011). Es por esto, que algunos investigadores han propuesto el uso de cultivos iniciadores para un mejor control del proceso de fermentación con el fin de mejorar la calidad del grano fermentado (Batista et al; 2015; Crafacck et al., 2013; Lefeber, Papalexandratou et al., 2012; Schwan, 1998). Sin embargo, en Colombia hasta ahora no se han utilizado cultivos iniciadores para la producción comercial de granos de cacao bien fermentados (Contreras, 2017).

En la presente investigación, se evaluó el efecto de mezclas de microorganismos promotores de la fermentación sobre la calidad del grano de cacao. Los resultados permitieron generar conocimiento para tratar de estandarizar la fermentación del grano y contribuir a mejorar su calidad.

4. JUSTIFICACIÓN

El cacao (*Theobroma cacao* L.) es un cultivo comercial de gran importancia económica en el mundo y la principal materia prima para la fabricación de chocolate (Ho, Zhao, & Fleet, 2015). Según la World Cocoa Foundation (WCF), hay cerca de 6 millones de agricultores en los países en desarrollo de África tropical, Asia y América Latina que producen alrededor del 90% del cacao en todo el mundo, y el número de personas que dependen del cacao para su sustento en todo el mundo es cercano a los 50 millones (WCF, 2012).

La producción mundial anual de cacao en grano fue aproximadamente de 4 millones de toneladas en el periodo 2015/2016. De la cual África siguió siendo la mayor región productora, con el 73% de la producción mundial de cacao, mientras que las cuotas de las Américas y de Asia y Oceanía se situaron en el 17% y el 10%, respectivamente (Pipitone, 2016).

En Colombia, el cultivo del cacao participa con el 1.5% de la producción agrícola nacional, beneficia a 40.000 familias campesinas en 230 municipios y genera 82 mil empleos directos permanentes (MADR, 2014), alcanzando la máxima producción en su historia en el año 2017, con un total de 60.535 toneladas (FEDECACAO, 2018). Además, el cacao es un sustituto de cultivos ilícitos (Arboleda & González, 2010) y es un cultivo conservacionista que no ejerce degradación del ecosistema, mitiga el cambio climático, protege y mejora los suelos (Perdomo, 2012). Por otra parte, el consumo de chocolate y otros productos de cacao contribuyen positivamente a la salud (Andújar et al., 2012). Esto es debido, a las propiedades antioxidantes (Di Mattia et al., 2014; Schinella et al., 2010), antiinflamatorias (Selmi et al., 2006) y anticancerígenas que han sido referenciadas (Martin et al., 2013).

El cacao colombiano es considerado fino de sabor y aroma, categoría que sólo pertenece el 5% del grano mundialmente comercializado según la Organización Internacional del Cacao (ICCO). Sin embargo, a pesar de las características organolépticas especiales del grano es muy frecuente que esta calidad organoléptica varíe o se vea deteriorada significativamente durante los procesos de

beneficio (fermentación y secado), afectando su aceptación en mercados especiales internacionales. En este sentido, esta investigación se enfocó en evaluar el efecto de mezclas de microorganismos seleccionados y referenciados sobre la calidad del grano de cacao.

5. OBJETIVOS

5.1. OBJETIVO GENERAL

Evaluar el efecto de la adición de mezclas de levaduras, bacterias ácido lácticas (BAL) y bacterias ácido acéticas (BAA) como microorganismos promotores de la fermentación de cacao para mejorar la calidad del grano.

5.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Seleccionar Levaduras, bacterias ácido lácticas (BAL) y bacterias ácido acéticas (BAA) por su capacidad de producción de pectinasas, ácido láctico y ácido acético, respectivamente.
- Optimizar la producción de pectinasas por levaduras asociada al cultivo de cacao teniendo en cuenta el tiempo de fermentación y pH.
- Establecer al menos dos mezclas de microorganismos potenciales para promover la fermentación de cacao.
- Evaluar la influencia de al menos una mezcla de microorganismos a escala piloto sobre la calidad del grano de cacao.

6. MARCO DE REFERENCIA

6.1. ESTADO DEL ARTE

La fermentación del grano de cacao es un proceso espontáneo (Nielsen et al., 2007) y empírico (Lagunes et al., 2007), que se caracteriza por una sucesión de actividades microbianas, donde participan levaduras, bacterias ácido lácticas (BAL) y bacterias ácido acéticas (BAA) (Ardhana & Fleet, 2003; Camu et al., 2007; Daniel et al., 2009; Lefeber et al., 2012; Schwan & Wheals, 2004). Estas actividades consecutivas dependen en gran medida de la calidad microbiológica (carga microbiana y diversidad de especies) y de los parámetros fisicoquímicos variables de la masa fermentada de cacao (en particular temperatura, pH, tensión de oxígeno, sustratos disponibles y metabolitos en la fermentación) (De Vuyst & Weckx, 2016).

El estudio de la microbiología de la fermentación del cacao ha llevado a investigaciones sobre el uso de cultivos iniciadores para obtener parámetros de fermentación reproducibles y una calidad de producto consistente (Meersman et al., 2013). El primer intento de usar un cultivo mixto definido, que consistió en una levadura, *Saccharomyces cerevisiae var. chevalieri*, dos especies bacterianas de ácido láctico, *Lactobacillus lactis* y *Lactobacillus plantarum*, y dos especies bacterianas de ácido acético *Acetobacter aceti* y *Gluconobacter oxydans subsp. Suboxydans* fue publicado por Schwan (1998), quien descubrió que la calidad de los granos de cacao de las fermentaciones inoculadas era casi idéntica a los granos de cacao de fermentación espontánea.

Un trabajo similar fue realizado por Lefeber et al. (2012), quienes probaron dos mezclas de microorganismos, uno compuesto por *Saccharomyces cerevisiae* H5S5K23, *Lactobacillus fermentum* 222, y *Acetobacter pasteurianus* 386B, y otro compuesto de *L. fermentum* 222 y *A. pasteurianus* 386B. El uso de las dos mezclas de microorganismos dio como resultado granos de cacao secos fermentados con un sabor confiable, independiente de la región productora de cacao y el método de fermentación. La mezcla compuesta por levaduras, bacterias ácido lácticas (BAL) y bacterias ácido acéticas (BAA) produjeron cacao con una calidad superior en

comparación con las fermentaciones inoculadas con BAL / BAA. En todas las fermentaciones de cacao inoculadas con mezclas de microorganismos, las especies pudieron superar la contaminación natural y prevalecieron durante toda la fermentación del grano de cacao.

En otro estudio, Crafacck et al. (2013) investigaron el uso de un cultivo iniciador mixto con cepas de *Pichia kluyveri* y *Kluyveromyces marxianus* en fermentaciones de bandeja a pequeña escala. Las cepas de levaduras influyeron positivamente en el perfil de sabor en comparación con un control espontáneamente fermentado. Esto sugiere que las levaduras tiene un impacto sobre la calidad sensorial del cacao. Otro estudio hecho por Crafacck et al. (2014), quienes evaluaron la influencia de la aplicación de cultivos iniciadores mixtos en la calidad sensorial del cacao, inoculado por una levadura aromática y una levadura pectinolítica. El perfil sensorial describió los chocolates fermentados espontáneamente en pilas y bandeja con sabores de cacao, dulce y caramelo, mientras que los chocolates inoculados se caracterizaron por tener sabores afrutados, ácidos, yogur y sabores balsámicos.

En otro trabajo, Batista et al; (2015) evaluaron el comportamiento dinámico de tres especies de levaduras, *Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia kluyveri* y *Hanseniaspora uvarum* durante las fermentaciones espontáneas e inoculadas de cacao a través de qPCR y su efecto sobre las características sensoriales del chocolate. Resultando la *Saccharomyces cerevisiae* como la especie más predominante durante las fermentaciones espontáneas e inoculadas. Además, la inoculación produjo chocolate con atributos más fuertes de café y notas amargas que el chocolate producido por fermentaciones espontáneas. Esta influencia de las levaduras sobre la característica sensoriales de los granos de cacao fue validada en un estudio hecho por Batista et al., (2016), en el cual evaluaron la influencia de la inoculación de las tres especies de levaduras mencionadas en el perfil de los compuesto volátiles en la fermentación de cacao. Los resultados mostraron que el grupo principal de compuestos volátiles de la fermentaciones inoculadas y espontáneas fueron ésteres (41 y 39%, respectivamente). Además, se encontraron diferencias en las características sensoriales de los chocolates. Puesto que, el chocolate inoculado mostró notas frutales más intensas, mientras que el chocolate producido por la

fermentación espontánea fue más astringente. Sin embargo, es de anotar que los atributos sensoriales también está influenciado por las variedades de cacao, incluso cuando se usa levadura como cultivo iniciador (Menezes et al., 2016).

Por otra parte, Sandhya et al. (2016), realizó la fermentación de cacao con un inóculo del 10-60% de un cultivo mixto compuesto por *Saccharomyces cerevisiae*, *Lactobacillus plantarum* y *Acetobacter acetii*. Dando como resultado, que el uso de 10% de inóculo del cultivo mixto regula la sucesión microbiana, hace que la fermentación sea constante, desarrolla características deseables de los granos de cacao y reduce el tiempo de fermentación a 3 días frente a los 7 días de la fermentación espontánea.

Entre los estudios más recientes, se destaca Moreira et al. (2017), quienes evaluaron la influencia de un cultivo mixto compuesto por *Saccharomyces cerevisiae* UFLA CCMA 0200, *Lactobacillus plantarum* CCMA 0238, y *Acetobacter pasteurianus* CCMA 0241 en la fermentación de las vainas de cacao del híbrido de cacao PH15. De acuerdo con los resultados, el sabor amargo fue el más dominante en los chocolates no inoculados, en cambio el chocolate hecho con granos inoculados mostró sabores agradables, dulce y de cacao. Así mismo, la adición de microorganismos aceleró el proceso de fermentación. Por último, Visintin et al. (2017), investigó el impacto de un cultivo mixto de *Saccharomyces cerevisiae* y *Torulaspota delbrueckii* en el proceso de fermentación realizado en dos híbridos de cacao, (PS1319 y SJ02), en Bahía, Brasil. Este estudio mostró que el inóculo influyó en la calidad del producto final del híbrido PS1319, cambiando el perfil analítico y la percepción sensorial de los chocolates. Entre tanto en el híbrido SJ02 no se registraron grandes influencias. Las fermentaciones inoculadas dieron como resultado un chocolate con valores más altos de sabor amargo deseable, sabor dulce, café, afrutado y tostado.

6.2. MARCO TEÓRICO

6.2.1. Generalidades del cacao

El cacao es el ingrediente esencial del chocolate (Fowler, 2009). El árbol del cacao (*Theobroma cacao*, L) es nativo de las regiones tropicales húmedas de la parte norte de América del Sur (Motamayor et al., 2002) y, se cree que se originó en los valles del Amazonas y el Orinoco (Afoakwa, 2010). *Theobroma cacao* L. es la única especie entre las 22 especies de *Theobroma* que produce los granos utilizados en la producción de chocolate (Wood, 1984). Es un árbol perenne, de 8 a 15 m de altura (Lima et al., 2011), que requiere condiciones cálidas y húmedas para crecer (CacaoNet, 2012).

El fruto del árbol de cacao es botánicamente una drupa indehisciente (Lima et al., 2011), normalmente conocido como mazorca (Batista, 2009). Estos son de forma ovalada, miden aproximadamente 12 cm de diámetro y 30 cm de largo, con surcos a lo largo, y un peso de 200 a 1000 g (Velásquez, 2016). En su interior, contienen de 30 a 40 granos (Lima et al., 2011), recubiertos por una pulpa mucilaginososa de color blanco y de sabor dulce y acidulado (Arango, 2017), que comprende aproximadamente el 40% del peso fresco del grano (Schwan & Wheals, 2004). La pulpa de cacao es un medio rico para el crecimiento microbiano (Lefeber et al., 2010). Consiste de 82 - 87% de agua, 10 - 15% de azúcares, 2 - 3% de pentosanos, 1 - 3% de ácido cítrico, 1 - 1.5% de pectina (Schwan & Wheals, 2004), 0.4 - 0.7% proteínas y 8 - 10% minerales y oligoelementos (Pereira, 2012).

El grano de cacao fresco y sin fermentar ("la semilla") consta básicamente de dos partes. Una parte exterior que comprende la testa (capa de semilla) que rodea el grano; y una parte interior que comprende el embrión (germen) y cotiledones dentro de la testa (Nielsen, 2006). Los cotiledones confieren sabores y aromas característicos del chocolate y se componen de dos tipos de células (Afoakwa, 2010). Las células de parénquima o almacenamiento, que contienen glóbulos de grasa, cuerpos de proteínas y gránulos de almidón, y células pigmentadas más grandes, que contienen polifenoles y metilxantinas (Lima et al., 2011), que imparten amargura y astringencia en cacao (Camu et al., 2008).

El cacao se cultiva principalmente entre los 20° de latitud norte y 20° de latitud sur del ecuador, en áreas con un ambiente adecuado para el cacao (Fowler, 2009; González et al., 2012). Alrededor del 70% de la producción mundial de cacao tiene lugar en la región ecuatorial de África Occidental, y el resto en las regiones ecuatoriales de América Central y del Sur, las Indias Occidentales y las zonas tropicales de Asia (Kongor et al., 2016). A nivel mundial Costa de Marfil es el primer productor con una participación del 42.7% del mercado mundial, seguido por Ghana con una participación del 20.5%. Colombia ocupa el décimo lugar con una participación del 1.2% (MADR, 2018).

En Colombia, la producción de cacao fue de 60.535 toneladas en el año 2017 (FEDECACAO, 2018). Lo cual significó un crecimiento del 6% con respecto al año anterior. Debido en gran parte a los apoyos del Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural (MADR) durante años anteriores en programas de siembra nueva, renovación de cacaotales envejecidos y un incremento en las áreas sembradas de cerca del 2% (MADR, 2018). En cuanto a la producción nacional por departamentos, Santander es el principal productor con una participación del 38.06% del total de la producción, seguido por Antioquia con el 8.93% y Arauca con el 8.32% (FEDECACAO, 2018).

6.2.2. Variedades de cacao

El cacao puede ser clasificado según su genotipo, es decir, según su linaje genético, determinado por su origen histórico o por su fenotipo, o sea, el lugar específico donde fue cultivado el árbol del cual se obtuvo el cacao (Cardona, 2016). Las principales variedades del árbol de cacao *Theobroma cacao* (familia Sterculiaceae) son Criollo, Forastero, Trinitario y Nacional (Afoakwa, 2010).

- Criollo: los frutos son pequeños y alargados, con surcos, de cáscara delgada y son típicamente de color rojo o amarillo, a veces verde o blanco (Figura 1). Los frutos tienen una cascara irregular (de cinco a diez surcos profundos) o verrugosa con puntas puntiagudas (Fahrurrozi, 2015). Los granos son de color blanco a marfil o tienen un color púrpura muy pálido, debido a un gen inhibidor de antocianina (Lima et al., 2011). Los árboles criollos son susceptibles a las enfermedades y producen bajos rendimientos (Fowler, 2009). Es una variedad

que se caracteriza por la amargura leve, finos aromas, y un sabor suave de nuez (González et al., 2012). Por esta razón, se ha hecho famoso y se le destina principalmente a la chocolatería fina (Alean, 2011). Hoy en día, su cultivo se limita a América Central y algunas regiones de Asia (Lima et al., 2011).

Figura 1. Fruto de cacao Criollo



Fuente: (De La Cruz et al., 2012).

- Forastero: es originario de la cuenca del Amazonas y se le conoce comúnmente como cacao a granel en el comercio (Kongor et al., 2016). Los frutos de forastero son de tamaño moderado, de cáscara gruesa, de color verde y relativamente lisa, con forma de bulbo o, a veces redondas (Figura 2) (Fahrurrozi, 2015). Los granos tienen un sabor fuerte, tienden a ser muy amargos y por lo general de color marrón oscuro (González et al., 2012). Por tanto, son adecuados para la fabricación de chocolate con leche (Badrie et al., 2015). Los árboles de cacao forastero son muy productivos y de mayor tolerancia a las enfermedades que el cacao criollo (Alean, 2011; Quintero & Díaz, 2004). Por esta razón, representan aproximadamente el 80 – 90% de la producción mundial de cacao (González et al., 2012).

Figura 2. Fruto de cacao Forastero



Fuente: (De La Cruz et al., 2012).

- Trinitario: se originó en Trinidad y cubre todos los productos de hibridación natural y recombinación del Criollo y Forastero (Kongor et al., 2016). Las vainas trinitarias pueden ser rojas o amarillas, así como naranjas o púrpuras, grandes alargadas pero no puntiagudas, moderadamente estriadas, a veces verrugosas o con cáscara relativamente lisa (Figura 3) (Fahurrozi, 2015). Los granos son de color variable, aunque raramente blancos (Kongor et al., 2016). Este genotipo es más resistente y productivo que el cacao criollo pero de inferior calidad (Quintero & Díaz, 2004). Al igual que el cacao criollo, se utiliza para hacer chocolate negro de alta calidad (Lima et al., 2011). Actualmente, se encuentra cultivado en México, Trinidad y Tobago, Colombia, Venezuela, en países productores del África y sureste de Asia; y representan el 10 - 15% de la producción mundial (González et al., 2012).

Figura 3. Fruto de cacao Trinitario



Fuente:(De La Cruz et al., 2012).

- Nacional: Es un cultivar que crece en el Ecuador (Saltini et al., 2013). Los frutos son grandes, verdes, de cáscara gruesa, ovaladas y ligeramente reducidas en la base (Figura 4) (Fahrurrozi, 2015). Este cacao es visto como una variedad fina, que produce los conocidos granos Arriba con notas distintivas de sabor floral y especiado (Kongor et al., 2016). Por tanto, tiene una alta demanda en el mercado del cacao (Badrie et al., 2015).

Figura 4. Fruto de cacao Nacional



Fuente: (Fahrurrozi, 2015).

6.2.3. Beneficio del cacao

El beneficio del cacao es el proceso que se realiza al grano después de la cosecha para que reúna las condiciones físicas, químicas y sensoriales que exige la industria y el consumidor final (Cubillos et al., 2008). Dicho proceso comprende dos pasos: la fermentación y el secado (Cardona, 2016). Durante la fermentación se inician diversos procesos bioquímicos dentro del grano, que conducen a la formación del color, aroma y precursores del sabor de chocolate (Pereira, 2012). Mediante el secado, se produce un producto estable y no perecedero (Fowler, 2009).

6.2.4. Fermentación del grano de cacao

La fermentación constituye un paso crítico esencial del proceso de poscosecha de los granos de cacao (Lima et al., 2011). Este proceso espontáneo e incontrolado (Moreira et al., 2017), es impulsado por una gran cantidad de microorganismos que se multiplican en la pulpa mucilaginosa que rodea a los granos. Lo cual causa cambios físicos y químicos que impactan en la fisiología y bioquímica del grano, y en última instancia, en la calidad del chocolate (Badrie et al., 2015). La fermentación tiene varios objetivos, que son los siguientes:

- I. Facilitar la eliminación de la pulpa viscosa alrededor de los granos y su posterior secado (De Vuyst & Weckx, 2016).
- II. Provocar la muerte del embrión e impedir la germinación de los granos de cacao (Steinau, 2017).
- III. Desencadenar cambios en las células del parénquima de las semillas, para formar los compuestos precursores del sabor (los aminoácidos libres, azúcares reductores y péptidos) (Lima, 2012).
- IV. Reducir la amargura y la astringencia de los granos, por intercambio de compuestos por difusión entre los cotiledones de granos de cacao y el medio ambiente (De Vuyst & Weckx, 2016).

El proceso de fermentación comienza después de retirar los granos de los frutos, que se abren manual o mecánicamente, se inoculan inmediatamente con una variedad de microorganismos provenientes de las manos de los trabajadores, la

superficie del fruto, los cuchillos, los contenedores usados en el transporte de la semilla, los insectos y los recipientes de fermentación (Cardona, 2016; De Vuyst & Weckx, 2016; Lima, 2012). Los microorganismos causan la descomposición de los azúcares de la pulpa, produciendo alcoholes (principalmente etanol) y ácidos orgánicos (ácido láctico y ácido acético), que al penetrar la testa, generan reacciones bioquímicas y enzimáticas que conllevan a la modificación de la composición química de los granos y también a la producción de precursores de sabor a chocolate (Arana-Sánchez et al., 2015; Arango, 2017; Ozturk & Young, 2017).

Los factores que influyen sobre el proceso de fermentación del grano de cacao son el tipo de cacao, el estado de madurez de los frutos, el tiempo de almacenamiento del fruto antes de la apertura y desgrane, el tipo de fermentador usado, tiempo del proceso y frecuencia de la remoción de la masa fermentante, la microflora y los cultivos iniciadores (Ortiz et al., 2009; Saltini et al., 2013). Los cuales afectan la composición y el sabor de los granos de cacao secos fermentados. Por ende, los chocolates producidos a partir de ellos (De Vuyst & Weckx, 2016).

La duración de la fermentación depende del tipo de cacao y de la región donde se cultiva. Por ejemplo, el cacao Criollo, con un sabor a nuez y chocolate suave, solo necesita de un corto periodo de fermentación. Mientras que el cacao Forastero, con un sabor de chocolate más fuerte, requiere de 5 a 8 días de para lograr un completo desarrollo del sabor. Al igual, los materiales Trinitarios también requieren de 5 a 8 días de fermentación (Ozturk & Young, 2017).

6.2.5. Métodos de fermentación

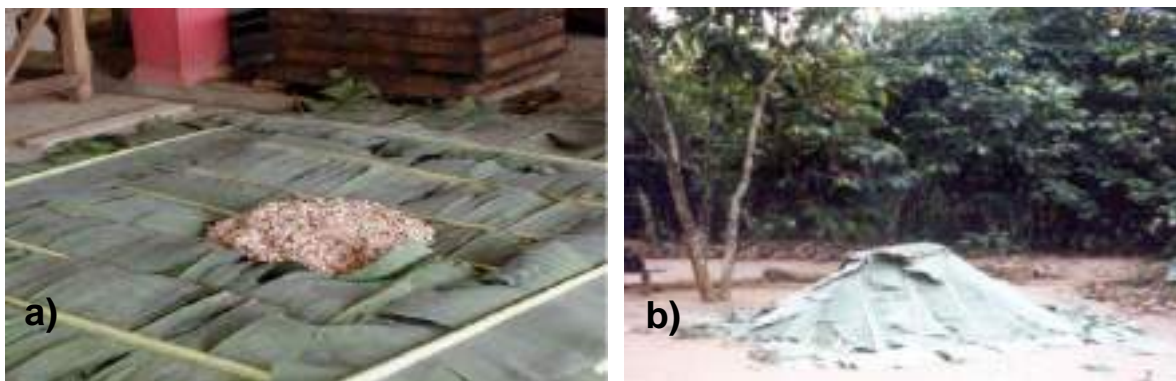
Los métodos de fermentación determinan en gran medida la calidad comercial de los granos de cacao producidos, especialmente el sabor (Guehi et al., 2010). Los métodos actuales de fermentación varían en diferentes países y regiones productoras de cacao e incluso de un productor a otro (Pereira, 2012). Los métodos de fermentación se pueden clasificar en cinco categorías: fermentación en plataformas de secado, fermentación en montones, fermentación en canastas,

fermentación en bandejas y fermentación en cajones (Guehi et al., 2010). De estos, los más utilizados son los métodos de cajón y montón (Fahrurrozi, 2015; Pereira, 2012).

- Fermentación en montones

La fermentación en montones es el método de fermentación más simple y es ampliamente utilizada en pequeñas plantaciones (Gutiérrez, 2017). En la fermentación en montones, los granos se apilan y se cubren con hojas de plátano o lona plástica (Figura 5). La cubierta protege la masa de fermentación contra insectos y mantiene el calor en el interior (Nielsen, 2006). La duración de la fermentación en montones es de alrededor de 4 a 7 días (Pereira, 2012). Este método es muy utilizado en Ghana y otros países de África Occidental (Fahrurrozi, 2015).

Figura 5. a) Montón en construcción; los granos se colocan en hojas de plátano. b) Montón cubierto con hojas de plátano



Fuente: (Nielsen, 2006).

- Fermentación en cajones

La fermentación en cajones se emplea con frecuencia en fincas o plantaciones más grandes (Gutiérrez, 2017). En este método, los cajones son construidos con tabloncillos de maderas resistentes a la humedad, que carezcan de resina y no desprendan sustancias extrañas que interfieran en la calidad final del grano (Figura 6) (Cardona, 2016). Los cajones de madera normalmente tienen orificios en los pisos, los cuales proporcionan ventilación y permiten que los fluidos se drenen

(Gutiérrez, 2017). El método de fermentación en cajón facilitan el giro, ya que el movimiento de los granos es ayudado por la gravedad y se puede producir cacao de buena calidad (Nielsen, 2006). Dicho método es ampliamente utilizado en Brasil, Indonesia y Malasia (Fahrurrozi, 2015; Pereira, 2012).

Figura 6. Fermentación en cajón sencillo



Fuente: (FEDECACAO, 2005).

- Fermentación en plataformas de secado

La fermentación en plataformas de secado se practica en partes de América Central donde se cultiva cacao Criollo (Doyle & Buchanan, 2013). En este método, los granos de cacao húmedos se extienden directamente sobre las plataformas de secado para fermentar y secar durante el día y, durante la noche, se amontonan en montones para conservar el calor y retardar el crecimiento de moho en la superficie (Figura 7). La fermentación toma solo uno 2-3 días y conserva el sabor fino del cacao Criollo, que requieren una fermentación corta (Schwan & Fleet, 2015). Este tipo de fermentación, se considera inapropiada para cacao Forastero, ya que requieren una fermentación más prolongada (5 a 8 días) (Saltini et al., 2013).

Figura 7. Fermentación en plataforma de secado



Fuente: (Dano et al., 2013).

- Fermentación en bandejas

La fermentación en bandejas se desarrolló en Ghana para lograr una uniformidad en la fermentación, que es el principal problema que se encuentra en la fermentación en montón y en caja (Schwan & Fleet, 2015). En este método de fermentación, los granos de cacao crudos son colocados en bandejas de 10 cm de profundidad y 8-10 bandejas apiladas una encima de la otra (Figura 8), que permite que el aire circule entre las bandejas, lo que garantiza la aireación de la masa fermentada sin voltear los frijoles (Nielsen, 2006).

Figura 8. Fermentación en bandejas



Fuente:(Nielsen, 2006).

- Fermentación en canastas

Es un método de fermentación que es muy popular en Nigeria y algunos otros países de África Occidental. También es muy popular en la región Amazónica, Filipinas y Vietnam. Las canastas están tejidas con materiales como la caña y la palma de aceite (Figura 9), con capacidad de 30 a 40 kg y, a veces, de hasta 90 kg. No son herméticos, pero están forrados con hojas de plátano antes de que los granos húmedos se carguen y se cubran con hojas adicionales. Esto ayuda a retener el calor, pero la base de la canasta generalmente se deja sin cubrir para permitir que los sudores se drenen. La duración de la fermentación en canastas suele ser de seis días (Schwan & Fleet, 2015).

Figura 9. Fermentación en canastas



Fuente: (Hatmi et al., 2015).

6.2.6. La microbiología de la fermentación de los granos de cacao

La fermentación del cacao consiste en una sucesión de diferentes poblaciones microbianas (incluyendo levaduras, bacterias ácido lácticas (BAL) y bacterias ácido acéticas (BAA)) (De Vuyst & Weckx, 2016; Moreira et al., 2017), que colonizan la pulpa mucilaginoso como sustrato para el crecimiento, y al hacerlo, producen una gama de productos metabólicos (alcoholes y ácidos orgánicos) que se difunden en los granos, y esto, en combinación con el calor producido, provoca la muerte del embrión de la semilla y el final de la fermentación (Ardhana & Fleet, 2003; Camu et al., 2007). Esto también ayuda a desencadenar una serie de reacciones bioquímicas

y cambios químicos dentro de los granos, que contribuyen a reducir la astringencia y amargura, y a la formación de moléculas precursoras para el desarrollo del sabor del chocolate (Camu et al., 2007; Pereira et al., 2013; Lagunes Gálvez et al., 2007; Visintin et al., 2016).

Diversos estudios han informado previamente que el proceso de fermentación del cacao está constituido de tres fases que son: la fase (1) o el crecimiento anaeróbico de levaduras; fase (2) o el crecimiento de bacterias ácido lácticas (BAL); y la fase (3) o el crecimiento de bacterias ácido acéticas (BAA) (De Vuyst & Weckx, 2016; Fahrurrozi, 2015; Pereira, 2012; Schwan & Wheals, 2004)

- Fase anaeróbica

Durante las primeras 24 – 48 h de fermentación (fase 1), las levaduras convierten los azúcares (sacarosa, glucosa y / o fructosa) en alcohol (etanol) (Figura 10b), en condiciones de altas concentraciones de carbohidratos, disponibilidad limitada de oxígeno (debido al empaquetado apretado de los frijoles) y un pH por debajo de 4.0 (debido al alto contenido de ácido cítrico en la pulpa de cacao) (Pereira, 2012). La densidad de levaduras aumenta de 10^7 a 10^8 unidades formadoras de colonias (UFC)/g durante las primeras 24 a 36 h del proceso de fermentación (Figura 10a), pero luego disminuye hasta que termina (Ardhana & Fleet, 2003; Gutiérrez, 2017). La producción de etanol es un proceso exotérmico que provoca un aumento de la temperatura en la masa de fermentación desde la temperatura ambiente 25-30 °C hasta 35-40 °C en 48 h. Además del etanol y sus productos secundarios dióxido de carbono y glicerol, las levaduras también producen ácidos orgánicos (como el ácido acético y el ácido succínico), que pueden tener una capacidad tampón en la masa de fermentación. Además, los volátiles producidos por las levaduras, tales como alcoholes superiores, aldehídos, cetonas y ésteres de ácidos grasos, pueden contribuir a la producción de aromas de cacao (precursores), una vez difundidos en los granos de cacao o liberados dentro de los granos mediante actividades de enzimas endógenas (De Vuyst & Weckx, 2016).

Las funciones más importantes de las levaduras son las siguientes: (i) la producción de etanol en condiciones de bajo oxígeno y alto contenido de azúcar, que finalmente se consume de forma oxidativa; (ii) la descomposición del ácido cítrico en la pulpa, que conduce a un aumento del pH de 3.5 a 4.2, lo que permite el crecimiento bacteriano; (iii) la producción de ácidos orgánicos (ácidos acético, málico, oxálico, fosfórico, succínico y tartárico), que tienen una capacidad amortiguadora y tienden a reducir las fluctuaciones en el pH; (iv) la producción de algunos compuestos orgánicos volátiles, que pueden contribuir al sabor del cacao o, más probablemente, a los precursores del sabor del chocolate; y (v) la secreción de pectinasas que disminuyen la viscosidad de la pulpa, aireando así los granos (Fahrurrozi, 2015; Gutiérrez, 2017).

Recientes estudios han indicado la participación de una abundante diversidad de levaduras en diferentes fermentaciones de pulpa de cacao, incluso para fermentaciones dentro del mismo país (Nielsen et al., 2007), que involucra diferentes géneros y especies como, *Candida*, *Cryptococcus*, *Debaryomyces*, *Eremothecium*, *Hanseniaspora*, *Kluyveromyces*, *Kodamaea*, *Lodderomyces*, *Meyerozyma*, *Pichia*, *Rhodotorula*, *Saccharomyces*, *Saccharomycopsis*, *Schizosaccharomyces*, *Torulopsis*, *Trichosporon*, *Vanderwaltozyma*, *Wickerhamomyces*, *Yarrowiay*, *Zygosaccharomyces* (Daniel et al., 2009; Lima et al., 2011; Meersman et al., 2013).

- Fase BAL

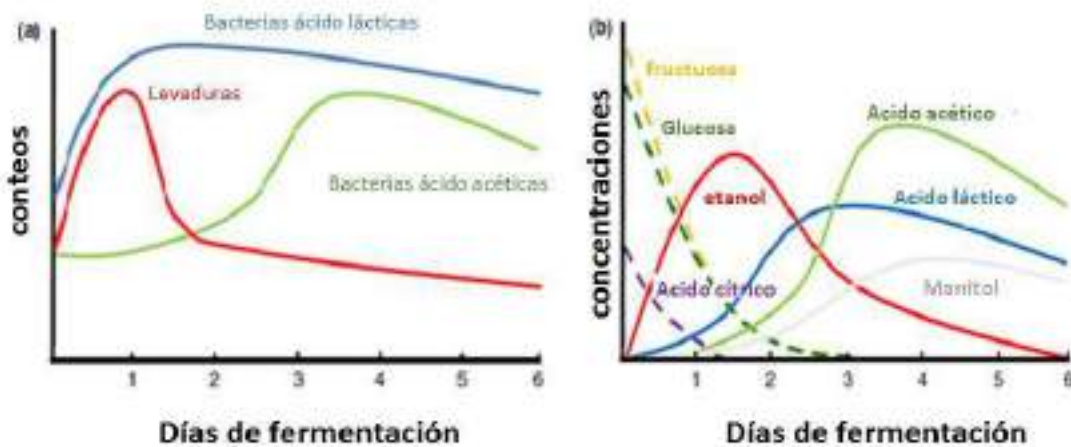
A medida que la fermentación continúa y la pulpa dreña, más aire entra en la pulpa de cacao, lo que crea las condiciones ideales para el crecimiento de bacterias, en particular enterobacterias, BAL y BAA consecutivamente, alrededor de 24-72 h de fermentación (Figura 10a) (De Vuyst & Weckx, 2016). Las bacterias ácido lácticas exhiben la tasa de crecimiento más rápida durante la primeras 48 h de fermentación (Schwan & Wheals, 2004) y alcanzan poblaciones de 10^8 - 10^9 (UFC)/g de pulpa (Gutiérrez, 2017). Esto coincide con un rápido descenso en el predominio de la población de levadura debido al agotamiento de las fuentes de energía apropiadas y la inhibición por una concentración de etanol cada vez más tóxica, la producción de calor, el aumento del pH y una mayor aireación (Fahrurrozi, 2015).

Se cree que las bacterias ácido lácticas (BAL) realizan tres actividades durante la fermentación del cacao: (i) fermentan azúcares de pulpa, principalmente glucosa y fructosa, a ácido láctico (Figura 10b) y cantidades menores de etanol y ácido acético, (ii) utilizan ácido cítrico en la pulpa para producir principalmente ácido láctico, ácido acético, acetaldehído, diacetilo, acetoína y 2,3-butanodiol y (iii) algunas especies pueden reducir la fructosa de la pulpa a manitol (Ho et al., 2015). De las bacterias del ácido láctico, *Lactobacillus plantarum* y *Lactobacillus fermentum* crecen con mayor frecuencia (Moreira et al., 2017), aunque se ha reportado las contribuciones de las especies de *Pediococcus* y *Leuconostoc* (Kostinek et al., 2008; Nielsen et al., 2007).

- Fase BAA aeróbica

Durante la fase aeróbica, creada por el drenaje de la pulpa y entrada de aire en la fermentación, especies de bacterias ácido acéticas (BAA) dominan durante las 48-112 h de fermentación (Figura 10a) (De Vuyst & Weckx, 2016). La BAA metabolizan el etanol formado inicialmente por las levaduras en ácido acético a través de un proceso exotérmico (Figura 10b) (Nielsen et al., 2007). Este proceso es responsable del aumento de la temperatura de la masa de cacao, que puede alcanzar 45 – 50 °C o más en algunas fermentaciones (Fahrurrozi, 2015). Esto causa una disminución en el número de bacterias ácido acéticas (Schwan & Wheals, 2004). El ácido acético producido por BAA aeróbico es un metabolito clave en la fermentación del cacao. El cual se difunde en los frijoles y, en combinación con el calor producido, causa la muerte del embrión de la semilla, la alteración de la estructura celular de los granos y la finalización del proceso de fermentación (Gutiérrez, 2017). Además induce cambios bioquímicos en los granos, lo que lleva a la formación de moléculas precursoras para el desarrollo de un sabor y color característicos de los granos (Camu et al., 2007). *Acetobacter pasteurianus* es la especie BAA más frecuente que participa en la fermentación espontánea de granos de cacao (De Vuyst & Weckx, 2016). También, *Acetobacter acetii*, *Acetobacter ghanensis*, *Acetobacter fabarum*, *Gluconobacter oxydans* y *Gluconobacter xylinus* se han reportado en la literatura (Moreira et al., 2017).

Figura 10. Dinámica microbiana. a) Cinética de degradación del sustrato y producción de metabolitos; b)



Fuente: adaptado de De Vuyst & Weckx, (2016).

6.2.7. Secado

El secado de los granos de cacao es un proceso de transferencia de calor y masa, que reduce el contenido de humedad de los granos de 60% a 6-8% para prevenir la infestación de moho durante el almacenamiento, y para que continúen algunos de los cambios químicos que ocurrieron durante la fermentación y mejoren el desarrollo del sabor (Kongor et al., 2016; Saltini et al., 2013). Durante este proceso, las principales reacciones de oxidación del polifenol son catalizadas por polifenol oxidasa, dando lugar a nuevos componentes de sabor y pérdida de la integridad de la membrana, induciendo la formación de color marrón en los granos (Afoakwa, 2010). Esto ayuda a reducir la amargura y la astringencia (Kongor et al., 2016), y la acidez (Gutiérrez, 2017). El secado puede ser realizado de manera natural o artificial (Figura 11) (Alean, 2011). El secado natural del grano de cacao depende directamente de las condiciones climáticas (Guehi et al., 2010). En este método, los granos de cacao se extienden en capas de 10 cm de grosor, ya sea directamente en el suelo o en terrenos cementados (Gutiérrez, 2017), es de fácil manejo en épocas soleadas, no requiere de técnicas especializadas y permite el secado en áreas de difícil acceso (Alean, 2011). Su desventaja radica en la necesidad de trabajo humano intensivo y, a su vez, conduce a un rendimiento operativo deficiente (Guehi et al., 2010). En el secado artificial, la velocidad de secado tiene una importante influencia en el sabor y la calidad de los granos secos. Si el secado es demasiado

lento, existe el peligro de que se produzcan sabores desagradables. Mientras que el secado rápido, puede causar el endurecimiento del grano, lo cual puede prevenir los cambios oxidativos, lo que resulta en una acidez excesiva (Fahrruzzi, 2015).

Figura 11. Métodos de secado; Secado natural a); Secado artificial b)



Fuente: (Cardona, 2016).

6.2.8. Calidad del grano de cacao

Los granos de cacao de buena calidad deben ser un sinónimo de excelente potencial de sabor (es decir, proporción adecuada de compuestos precursores del sabor del cacao) y composición equilibrada de los metabolitos del sabor de fermentación, excelente color (completamente marrón), alto rendimiento de material utilizable y ausencia de contaminantes (Lima, 2012).

De acuerdo con Lima et al (2011), los aspectos de calidad de los granos de cacao se agrupan en tres áreas principales:

- Económico: se relaciona con el contenido de materia útil. El precio que los fabricantes esta dispuestos a pagar depende de parámetros como el tamaño del grano, el contenido de grasa o la presencia de granos germinados e infestados.
- Calidad: se relaciona con el sabor de los granos de cacao e incluye factores tales como la ausencia de sabores desagradables, la presencia de sabores auxiliares deseables (por ejemplo, floral, picante y afrutado) y algunas propiedades físicas, como la dureza de la manteca de cacao, la fusión, y comportamiento de solidificación.

- Salubridad: se relaciona con la seguridad alimentaria (micotoxinas, pesticidas, metales pesados, o materiales extraños). Los límites están regulados por la legislación nacional de alimentos en el país donde se encuentra la fábrica o a través de organismos reguladores como la Unión Europea (UE) y la Administración de Alimentos y Medicamentos (FDA) en los Estados Unidos.

6.2.9. Calidad física del grano de cacao

La calidad física se basa principalmente en la presentación exterior del grano, a través de la clasificación que imponen los países compradores y fabricantes de chocolate a los granos por su apariencia física, la humedad, contenido de materiales extraños, los mohos, los insectos y otros (Steinau, 2017). En Colombia, la clasificación del cacao en grano se hace a través de la Norma Técnica Colombiana (NTC) 1252 (Icontec, 2003), la cual emplea la prueba de corte como método para evaluar la calidad y el grado de fermentación de los granos de cacao. En la tabla 1, se especifica los requisitos de la NTC 1252 que debe cumplir el cacao en grano.

Tabla 1. Requisitos del grano de cacao NTC 1252

Requisitos	Premio	Corriente	Pasilla
Contenido de humedad en % (m/m). Máx.	7	7	7
Contenido de impurezas o materias extrañas en % (m/m).Máx.	0	0.3	0.5
Grano mohoso interno número de granos/100granos.Máx.	2	2	3
Grano dañado por insectos y/o germinados, número de granos/100granos.Máx.	1	2	2
Contenido de pasilla, número de granos/100granos.Máx.	1	2	
Contenido de almendra en % (m/m) .min.	-	-	40-60
Masa (peso) en g/100 granos. Min	120	105-119	40
Granos bien fermentados, número de granos/100granos.min.	65	65	60
Grano insuficientemente fermentados, número de granos/100granos. Máx.	25	35	40
Granos pizarrosos, número de granos/100granos.max.	1	3	3

Fuente: Norma Técnica Colombiana NTC 1252 (2003).

6.2.10. Calidad sensorial del grano de cacao

El sabor es fundamental para la aceptabilidad de los granos de cacao y productos de cacao como el chocolate (Afoakwa, 2010). Además es la propiedad más importante para los fabricantes de chocolate (Fowler, 2009). Los sabores característicos de los granos de cacao se deben a una fracción volátil (Magi et al., 2012). Esta fracción es una combinación de compuestos naturalmente presentes en la semilla fresca y compuestos formados y perdidos durante las etapas de fermentación, secado y tostado (Lima et al., 2011). Se han reportado más de 600 compuestos de sabor a partir de granos de cacao y productos de cacao (Saltini et al., 2013). Estos compuestos comprenden aldehídos, pirazinas, ácidos, alcoholes, ésteres, cetonas, furanos, pirroles, fenoles, terpenos y alcoholes terpénicos (Crafack et al., 2014). Los cuales les proporcionan a los granos características particulares de sabor (Saltini et al., 2013). Por ejemplo, las pirazinas y aldehídos proporcionan el sabor a cacao y nuez, ésteres involucrados en el sabor frutal y componentes fenólicos responsables de las propiedades astringentes (Martínez, 2016).

Los atributos sensoriales de los granos de cacao se evalúan principalmente mediante pruebas sensoriales (Afoakwa, 2010). Estas pruebas permiten medir, analizar e interpretar la percepción de las cualidades de un producto (González et al., 2012). Para evaluar el sabor de una muestra de cacao en grano, primero la muestra se debe convertir en licor o bien en chocolate; a continuación se procede a su degustación, que suele correr a cargo de un panel de cata (CAOBISCO et al., 2015), que evalúa el sabor a cacao, la amargura, la astringencia, la acidez y las notas frutales y florales (Luna et al., 2002).

7. MATERIALES Y MÉTODOS

7.1. LOCALIZACIÓN

Este proyecto se desarrolló en el laboratorio de microbiología del Centro de Investigación Nataima – Agrosavia, ubicado en el Km. 9 vía Espinal – Ibagué, altitud 418 m.s.n.m. y coordenadas geográficas de 4°11'31,65" de Latitud Norte (N) y 74°57'41,49" de Longitud Oeste (W).

La macrofermentación se llevó a cabo en una finca productora de cacao, en el municipio de Guamo – Tolima, a una altura de 321 m.s.n.m. y coordenadas geográficas de 4° 1' 41" (N) y 74° 58' 12" (W).

7.2. MATERIAL VEGETAL

Se emplearon frutos de cacao del genotipo ICS 95 y CCN 51, obtenidos de una finca de productora de cacao ubicada en Algeciras (Huila – Colombia), municipio que se encuentra entre las coordenadas geográficas 2°31'19" (N) y 78°18'52" (W) y a una altitud media de 1528 msnm.

Figura 12. Ubicación geográfica de recolección de frutos de cacao



Fuente: Google maps.

7.3. MATERIAL BIOLÓGICO

Se utilizaron 28 aislados de levaduras, 15 aislados de bacterias ácido lácticas (BAL) y 7 aislados de bacterias ácido acéticas (BAA) preseleccionadas por sus comportamientos en diferentes pruebas (crecimiento en pulpa de cacao (50%) y en altas concentraciones de etanol (5%), glucosa (10%), ácido acético (7%), pH ácido (3.0)). Los aislados fueron obtenidos del proceso de fermentación del cacao en tres regiones de Colombia (Antioquia, Huila y Santander) y conservados en un banco de trabajo del Centro de Investigación Nataima de Agrosavia. Los aislados fueron codificados con el lugar de procedencia, tipo de medio de cultivo usado para el aislamiento, momento de aislamiento y un número consecutivo (Tablas 2, 3 y 4).

Tabla 2. Especies de levaduras aisladas de la filofera y fermentación del cacao en tres regiones de Colombia

No.	Especie	Código ^a
62	<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	RHLM3-1
63	<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	RHLM3-2
65	<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	RHLM3-4
67	<i>Debaryomyces hansenii</i>	RHLM13-1
73	<i>Meyerozyma guilliermondii</i>	SVCHLM5-1
75	<i>Debaryomyces hansenii</i>	SVCHLM5-2
78	<i>Debaryomyces hansenii</i>	SVCHLM5-5
87	<i>Meyerozyma guilliermondii</i>	MANTLM5-1
88	<i>Meyerozyma guilliermondii</i>	MANTLM7-2
90	<i>Meyerozyma guilliermondii</i>	MANTLM9-2
92	<i>Meyerozyma guilliermondii</i>	MANTLM12-2
93	<i>Meyerozyma guilliermondii</i>	MANTLM13-1
94	<i>Meyerozyma guilliermondii</i>	MANTLM13-2
95	<i>Meyerozyma guilliermondii</i>	MANTLM14-1
97	<i>Meyerozyma guilliermondii</i>	MANTLM14-3
99	<i>Meyerozyma guilliermondii</i>	MANTLM4-2
116	<i>sin identificar</i> *	RHEMM5-7
131	<i>sin identificar</i> *	SVCHEMM1-3
134	<i>sin identificar</i> *	SVCHEMM2-3
135	<i>sin identificar</i> *	SVCHEMM3-2
137	<i>sin identificar</i> *	SVCHEMM4-1
140	<i>sin identificar</i> *	SVCHEMM5-4
141	<i>sin identificar</i> *	SVCHEMM5-5
142	<i>sin identificar</i> *	SVCHEMM5-6
163	<i>sin identificar</i> *	MANTEMM1-1

169	<i>Pichia kudriavzevii</i> *	MANTEM3-1
178	<i>sin identificar</i> *	MANTEM9-1
303	<i>Aureobasidium pullulans</i> *	MANTEMA5F2

Fuente: Banco de microorganismos de Agrosavia .

*Especies de levaduras aisladas de la filosfera del cacao.

^a Aislamientos en tres regiones de Colombia (Huila, Santander y Antioquia).

RH: Rivera Huila, SVCH: San Vicente de Chucuri Santander, MANT: Maceo Antioquia.

L: medio de levaduras. EM: extracto de Malta.

Tabla 3. Especies de bacterias ácido lácticas (BAL) aisladas de la fermentación de cacao en tres regiones de Colombia

No.	Especie	Código*
6	<i>Pediococcus acidilactici</i>	RHALM12-1
7	<i>Pediococcus acidilactici</i>	RHALM12-2
12	<i>Pediococcus acidilactici</i>	SVCHALM2-3
13	<i>Pediococcus acidilactici</i>	SVCHALM2-5
24	<i>Lactobacillus brevis</i>	SVCHALM5-6
34	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	SVCHALM8-2
44	<i>Pediococcus acidilactici</i>	MANTALM9-1
46	<i>Lactobacillus farraginis</i>	MANTALM10-2
209	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	RHALM6-1
308	<i>Lactobacillus plantarum</i>	AHALM6-1
309	<i>Lactobacillus plantarum</i>	AHALM4-1
314	<i>Lactobacillus plantarum</i>	AHALM4-3
315	<i>Lactobacillus plantarum</i>	AHALM6-4
316	<i>Sin identificar</i>	AHALM6-3
317	<i>Sin identificar</i>	AHALM6-2

Fuente: Banco de microorganismos de Agrosavia .

* Aislamientos en tres regiones de Colombia (Huila, Santander y Antioquia).

RH: Rivera Huila, SVCH: San Vicente de Chucuri Santander, MANT: Maceo Antioquia,

AH: Algeciras Huila. AL: medio ácido lácticas.

Tabla 4. Especies de bacterias ácido acéticas (BAA) aisladas de la fermentación de cacao en tres regiones de Colombia

No	Especie	Código*
286	<i>Gluconobacter sp</i>	MANTAAM12-4
287	<i>Gluconobacter japonicus</i>	MANTAAM13-1
307	<i>Acetobacter tropicalis</i>	AHAAM6-3
310	<i>Acetobacter tropicalis</i>	AHAAM6-1
311	<i>Acetobacter pasteurianus</i>	AHAAM6-2
312	<i>Acetobacter tropicalis</i>	AHAAM6-4
313	<i>Acetobacter malorum</i>	AHAAM6-5

Fuente: Banco de microorganismos de Agrosavia .

* Aislamientos en tres regiones de Colombia (Huila, Santander y Antioquia).

RH: Rivera Huila, SVCH: San Vicente de Chucuri Santander, MANT: Maceo Antioquia.

AH: Algeciras Huila. AA: medio ácido acéticas.

7.4. SELECCIÓN DE LEVADURAS POR SU CAPACIDAD DE PRODUCCIÓN DE PECTINASAS

La actividad pectinolítica de 28 aislados de levaduras fue evaluada en medio sólido de pectina cítrica y agar pulpa de cacao (APC).

7.4.1. Preparación de medios de cultivos

- ✓ Medio de pectina cítrica: 0.5% de Peptona de caseína, 0.5% de Extracto de levadura, 0.1% de CaCO₃, 0.1% KH₂PO₄, 2.0% de Agar, 1000 mg/L de Cloranfenicol y 1% de Pectina cítrica como única fuente de carbono. Se utilizó un pH de 4.0 para el medio de cultivo.
- ✓ Medio agar pulpa de cacao (APC): 50% de Pulpa de cacao y 2.0% de Agar. Se esterilizó separadamente la pulpa de cacao y la solución de agar, las cuales se mezclaron en cámara y fue dispensado en cajas Petri de 9 cm de diámetro.

7.4.2. Activación del microorganismo

Del banco de levaduras se tomó un tubo (por aislado) del cual se extrajeron 100 µL que fueron sembrados en un medio para levaduras (Schwan, 1998), una vez que el crecimiento cubrió la caja (aproximadamente 5 días después de la siembra) se obtuvo el inóculo.

7.4.3. Evaluación de la producción de pectinasas

Se preparó una suspensión del microorganismo teniendo en cuenta la turbidez del tubo No 2 de Mcfarland. Un volumen de 10 μ L fue colocado en 5 puntos de la caja que contenían el medio de cultivo (APC y Medio de pectina). Las cajas sembradas fueron incubadas durante 6 días a 30 °C. Transcurrido el tiempo de incubación, se midió el diámetro de cada una de las colonias. Después, se adicionó 7 mL de solución Yodo – Yoduro de Potasio (1.0 g de Yodo, 5.0 g de Yoduro de Potasio y 330 mL de agua destilada) a cada caja de Petri. Dicha solución se dejó actuar por 15 min; luego, se retiró el colorante lavando suavemente con agua la superficie del medio para detectar y cuantificar la formación de halos (Soares et al., 1999).

7.5. SELECCIÓN DE AISLADOS DE BACTERIAS ÁCIDO LÁCTICAS (BAL) POR SU PRODUCCIÓN DE ÁCIDO LÁCTICO

7.5.1. Preparación del medio de cultivo

- ✓ Medio MRS: Peptona 1%, Extracto de levadura 0.4%, Glucosa 2%, Acetato de sodio 0.5%, Sulfato de magnesio 0.02%, Sulfato de manganeso 0.005%, Citrato de sodio 0.2%, Sulfato de amonio 0.3%, Fosfato dipotásico 0.2%, Tween 80, un ml por litro. El medio líquido fue suplementado con Pulpa de tomate 10% y Pulpa de cacao 1% (Ardhana & Fleet, 2003). Un volumen de 15 mL del medio de cultivo fue dispensado en tubos de ensayo de tapa rosca. El pH del medio fue ajustado a 7.0 ± 0.2 después de autoclavar con 0.5 N de HCl estéril.

7.5.2. Activación del microorganismo

Del banco de bacterias ácido lácticas se tomó un tubo (por aislado) del cual se extrajeron 100 μ L que fueron sembrados en medio MRS, una vez que el crecimiento cubrió la caja se obtuvo el inóculo.

7.5.3. Evaluación de la producción de ácido láctico

El medio líquido (15 mL) fue inoculado con 375 μ L de la suspensión del microorganismo a evaluar, cuya concentración fue estandarizada con el tubo No 2 de McFarland. Los microorganismos fueron incubados en condiciones de bajo oxígeno y sin agitación, para lo cual, luego de sembrados los tubos fueron colocados en frascos bomboneros a los cuales se les eliminó el oxígeno mediante

una llama. La siembra se hizo por triplicado, incluyendo el control y permanecieron incubados durante 5 días a 30 °C.

Luego de 5 días de fermentación, los cultivos fueron centrifugados a 12.000 rpm durante 20 minutos y el pellet formado se sometió a secado para determinar gravimétricamente la biomasa del microorganismo. Se utilizaron tubos Falcón previamente pesados para este fin. Para la determinación del ácido, se utilizaron 10 mL del sobrenadante para neutralizar el ácido contenido en la alícuota mediante una solución de NaOH 1N. Luego se determinó la producción de ácido láctico mediante la siguiente ecuación 1.

$$\% \text{ de ácido láctico} = \frac{B \times N \times K}{W} \times 100$$

Ecuación 1. Producción de ácido láctico.

Dónde:

B = Volumen de NaOH (mL) consumido en la titulación.

N=Normalidad del NaOH 1N.

K=miliequivalente del ácido láctico (0.09).

W= volumen de la muestra.

7.6. SELECCIÓN DE AISLADOS DE BACTERIAS ÁCIDO ACÉTICAS (BAA) POR SU PRODUCCIÓN DE ÁCIDO ACÉTICO.

7.6.1. Preparación del medio de cultivo

- ✓ Medio BAA: Extracto de levadura 1%, Peptona 4%, Glucosa 6%, Carbonato de calcio 1%. Un volumen de 25 mL del medio de cultivo se dispuso en un matraz de 100 mL. El pH del medio fue ajustado a 7.0 ± 0.2 con HCl 0.5 N estéril después de autoclavar.

7.6.2. Activación del microorganismo

Del banco de bacterias ácido acéticas (BAA) se tomó un tubo (por aislado) del cual se extrajeron 100 microlitros que fueron sembrados en un medio sólido de BAA (Ohmori, Uozumi, & Beppu, 1982). Una vez que el crecimiento cubrió la caja se obtuvo el inóculo.

7.6.3. Siembra del microorganismo

El medio líquido (25 mL) fue inoculado con 1 mL de la suspensión del aislado a evaluar. La concentración del microorganismo se estandarizó con el tubo No. 2 de McFarland. Después se incubó por 2 días, bajo agitación y a 30 °C. La siembra se hizo por triplicado, incluyendo el control.

7.6.4. Evaluación de la producción de ácido acético

Luego de 2 días de fermentación, los cultivos fueron centrifugados a 12.000 rpm por 20 minutos y el pellet formado se sometió a secado para determinar la biomasa. Se utilizaron tubos Falcón previamente pesados para este fin.

Para la evaluación de la producción de ácido, se utilizaron 20 mL del sobrenadante para neutralizar el ácido contenido en la alícuota mediante una solución de NaOH 1N. Luego se determinó el porcentaje de ácido acético mediante la ecuación 2.

$$\% \text{ de ácido acético} = \frac{B \times N \times K}{W} \times 100$$

Ecuación 2. Producción de ácido acético.

Dónde:

B = Volumen de NaOH (mL) consumido en la titulación.

N=Normalidad del NaOH 1N.

K=miliequivalente del ácido acético (0.06).

W= volumen de la muestra.

7.7. OPTIMIZACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE PECTINASAS POR *Aureobasidium pullulans* AISLADA DE LA FILOSFERA DEL CACAO

Se evaluó la influencia de dos factores (pH del medio y tiempo de fermentación en medio líquido) en la producción de pectinasas de una levadura identificada como *Aureobasidium pullulans* obtenida de la corteza de frutos de cacao.

Se prepararon medios de cultivo líquido con cuatro pH (3.5, 4.5, 5.5, y 6.5). El pH fue ajustado después de la esterilización del medio. Para determinar el efecto del tiempo de fermentación, se evaluaron cuatro tiempos de fermentación (24, 72, 120 y 168 horas después de la inoculación).

Las variables a evaluar fueron producción de biomasa, determinación de proteínas, concentración de pectinasas y actividad de poligalacturonasa (PG).

7.7.1. Preparación del medio de cultivo

- ✓ Medio – pectina: Pectina cítrica al 1%, Peptona de caseína 2%, Extracto de levadura 1%, CaCO_3 0.1%, KH_2PO_4 0.1%, Glucosa 0.05% y Cloranfenicol 500 mg/l. Se utilizaron 50 ml de medio de cultivo por matraz. El pH del medio fue ajustado luego de la esterilización. La pectina cítrica se esterilizó por separado y luego se agregó en cámara al medio de cultivo.

7.7.2. Siembra del microorganismo

El medio de líquido (30 mL) de pectina fue inoculado con 1 ml de la suspensión del aislado a evaluar. La concentración del microorganismo se estandarizó con el tubo No. 2 de McFarland.

7.7.3. Obtención del extracto enzimático

Luego de la fermentación en cultivo líquido, este fue centrifugado a 12.000 rpm por 20 minutos. El pellet formado fue utilizado para determinar la biomasa y el sobrenadante fue guardado en refrigeración para determinar la concentración de pectinasas y la actividad de poligalacturonasa (PG) por el método de DNS.

7.7.4. Determinación de proteínas

La determinación de proteínas se realizó mediante el método de Bradford (Bradford, 1976). La mezcla de reacción contenía 240 μL del extracto del microorganismo y 2400 μL de reactivo Bradford, se agitó e incubó por 15 min. Luego se leyó la absorbancia en el espectrofotómetro a 595 nm. Se utilizó Albúmina de Suero Bovino (ABS) (Sigma) como estándar.

7.7.5. Determinación de la concentración de pectinasas

- ✓ Purificación de las enzimas pectinasas.

Para la purificación de las enzimas pectinasas se preparó una solución madre de cloruro de calcio ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) al 30% (P/V) y una solución madre fosfato ácido de sodio ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$) al 27% (P/V). En un tubo Falcón se depositó 5 mL de la solución madre de cloruro de calcio y 5 mL de la solución madre de fosfato ácido de sodio. Luego se agregó 20 mL del sobrenadante del microorganismo a evaluar. La mezcla se agitó por 1 hora en un agitador magnético a temperatura ambiente, por 2 horas a 4 °C y se incubó en refrigeración durante 16 horas. Luego de la incubación se separó el gel fosfato de calcio al centrifugar a 2.310 rpm durante 20 min y se recuperó el líquido sobrenadante (Extracto de pectinasas).

- ✓ Concentración de las enzimas pectinasas.

En un tubo Falcón previamente pesado se colocó el volumen del líquido sobrenadante (extracto de pectinasas), se adicionó lentamente y con agitación constante etanol al 96% a 4°C, en relación 3(sobrenadante): 1(etanol), y se incubó durante 16 horas a 4°C con el fin de precipitar la enzima pectinasa. Para recuperar el precipitado (pectinasas) se centrifugó a 2.310 rpm durante 20 min y se eliminó el sobrenadante. El tubo con el pellet se secó a temperatura ambiente. Una vez seca la muestra se registró el peso final (tubo + enzima) determinando la concentración en mg de pectinasa / ml de extracto purificado. La determinación de concentración de pectinasas se realizó por triplicado.

7.7.6. Determinación de la actividad de poligalacturonasa (PG) por el método del ácido dinitrosalicílico (DNS)

La actividad de Poligalacturonasa se determinó midiendo la cantidad de azúcares reductores producidos como resultado de la hidrólisis enzimática de la pectina cítrica, utilizando el método del Ácido Dinitrosalicílico (DNS). La mezcla de reacción contenía 1.2 mL de solución de pectina cítrica (0.5% p/v) en buffer de acetato de sodio (pH 4.5) y 1.2 mL del extracto enzimático. Esta mezcla se incubó durante 90 min a 40 °C. Después del tiempo de incubación, se agregaron 1.2 mL de DNS a la mezcla, se agitó y calentó en baño maría (80 °C) durante 5 min. La mezcla se enfrió en baño de hielo a 4°C durante 5 min. Por último, se midió la cantidad de productos de reacción con un espectrofotómetro UV-Vis, a 575 nm, usando solución de glucosa (Merck) como estándar. Una unidad (U) de actividad de Poligalacturonasa fue definida como la cantidad de enzima que libera 1µmol de glucosa por minuto, bajo condiciones experimentales. La producción de enzima se definió como la cantidad de unidades producidas por ml del extracto enzimático de levadura.

7.8. EVALUACIÓN DE MEZCLAS DE MICROORGANISMOS POTENCIALES PARA LA FERMENTACIÓN

7.8.1. Producción del inóculo

Para la producción del inóculo, se utilizaron microorganismos del banco de trabajo del C.I. Nataima de la Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria, dos especies de levaduras *Wickerhamomyces anomalus* (RHLM3-4) y *Debaryomyces hansenii* (RHLM13-1), tres especies de bacterias ácido lácticas *Lactobacillus brevis* (SVCHALM5-6), *Lactobacillus plantarum* (AHALM4-3), y *Pediococcus acidilactici* (MANTALM9-1) y tres especies de bacterias ácido acéticas *Gluconobacter japonicus* (MANTAAM12-4), *Acetobacter tropicalis* (AHAAM6-1) y *Acetobacter pasteurianus* (AHAAM6-2). La producción de biomasa de cada microorganismo fue realizada en un medio específico. Para las levaduras, se utilizó medio de extracto de malta (5%), a pH de 5.0. Las BAL fueron sembradas en medio MRS modificado, suplementado con pulpa de tomate (10%) y pulpa de cacao (1%), leche en polvo (2%) como recurso de carbono, pH 5.6. Las BAA se sembraron en medio que contiene glucosa (6%),

peptona (4%), extracto de levadura (1%), carbonato de calcio (1%) y etanol (0.5%), pH 5.7 (López, 2018). La concentración del microorganismo fue estandarizada con el tubo No 2 de McFarland (aproximadamente 6×10^8 ufc/mL). Se sembraron 7.5 mL de la suspensión del microorganismo en 400 mL de medio. La incubación de los cultivos se realizó a 30 °C durante 96 h.

Después de 96 horas de fermentación, en cámara se realizaron las mezclas de microorganismos (Tabla 5) teniendo en cuenta 1% (v/p v:volumen de suspensión de microorganismos, p:peso de la masa de cacao); para la proporción 1, se tomaron 4 mL del medio de cultivo de cada microorganismo y para la proporción 2 se tomaron 8 mL. El inóculo mixto de cada unidad experimental fue centrifugado a 12.000 rpm durante 20 min, el sobrenadante eliminado y la biomasa obtenida se resuspendió en 4 ml de solución salina estéril (0.85% de NaCl p/v) y se agregó como inóculo a 400 g de granos de cacao. Las unidades experimentales del control fueron tratadas con 4 ml de solución salina.

Tabla 5. Mezclas de microorganismos evaluadas sobre la calidad del grano de cacao

TRATAMIENTO	DESCRIPCIÓN
Control	Granos de cacao sin inóculo: 4 ml de solución salina
1:1:1	1 proporción de Levaduras: 1 proporción de BAL: 1 proporción de BAA 4 ml/cada microorganismo de levaduras: 4 ml/cada microorganismo de BAL: 4 ml/cada microorganismo de BAA.
1:2:1	1 proporción de Levaduras: 2 proporción de BAL: 1 proporción de BAA 4ml cada microorganismo de levaduras: 8ml/cada microorganismo de BAL: 4ml/cada microorganismo de BAA.
1:1:2	1 proporción de Levaduras: 1 proporción de BAL: 2 proporción de BAA 4ml/microorganismos de levaduras: 4 ml/cada microorganismo de BAL: 8ml/cada microorganismo de BAA.
1:2:2	1 proporción de Levaduras: 2 proporción de BAL: 2 proporción de BAA 4 ml cada microorganismo de levaduras: 8 ml/cada microorganismo de BAL: 8 ml/cada microorganismo de BAA.
2:1:1	2 proporción de Levaduras: 1 proporción de BAL: 1 proporción de BAA 8 ml/microorganismos de levaduras: 4 ml/cada microorganismo de BAL:4 ml/cada microorganismo de BAA
2:2:1	2 proporción de Levaduras: 2 proporción de BAL: 1 proporción de BAA 8 ml/microorganismos de levaduras: 8 ml/cada microorganismo de BAL:4 ml/cada microorganismo de BAA
2:1:2	2 proporción de Levaduras: 1 proporción de BAL: 2 proporción de BAA 8 ml/microorganismos de levaduras: 4 ml/cada microorganismo de BAL:8 ml/cada microorganismo de BAA
2:2:2	2 proporción de Levaduras: 2 proporción de BAL: 2 proporción de BAA 8 ml/microorganismos de levaduras: 8 ml/cada microorganismo de BAL:8 ml/cada microorganismo de BAA

7.8.2. Microfermentación

Los frutos de cacao se lavaron y desinfectaron superficialmente con hipoclorito de sodio (1%) y alcohol (70%). Luego de desinfectar y lavar con agua los frutos de cacao, estos se cortaron manualmente y los granos se separaron de la placenta. Posteriormente, 400 g de granos de cacao se colocaron en tarrinas de plástico, estas tarrinas estaban provistas de orificios para el drenaje del lixiviado que se genera durante la fermentación (Figura 13). Las tarrinas con los granos de cacao se inocularon con los respectivos tratamientos (Tabla 5) y se estableció un sistema cerrado. Los tratamientos fueron incubados durante 168 h (Sandhya et al., 2016). Durante los primeros tres días de la fermentación, la temperatura se mantuvo a 35°C (fase anaeróbica), a partir del día 3 la temperatura fue ajustada a 45°C (fase aeróbica). A partir de este momento (72 horas), se rompió el sistema cerrado, y se comenzó la etapa de aireación en la fermentación mediante la remoción de los granos hasta el final de la fermentación. Durante el proceso, se hizo un seguimiento de los parámetros fisicoquímicos de la semilla (pH interno de la semilla, acidez titulable, prueba de corte e índice de fermentación) en un tiempo fijo (24, 72, 120 y 168 h después de la inoculación). Al final de la fermentación se realizó un análisis sensorial con 5 panelistas entrenados. Por cada tratamiento se establecieron 7 repeticiones. Para cada momento de muestreo se extrajo una repetición por tratamiento a la cual se le midieron las variables fisicoquímicas.

Figura 13. Microfermentación de granos de cacao en tarrinas plásticas incubadas a 35°C durante la fase anaeróbica



Fuente: Autor.

7.8.3. Secado

Después del proceso de fermentación, los granos de cacao de cada tratamiento fueron secados al sol durante 5 días. Los cuales fueron distribuidos uniformemente en plataformas de secado construidos en acero inoxidable (Figura 14). Los granos fueron removidos periódicamente durante las horas de sol hasta alcanzar una humedad final de 7- 8%.

Figura 14. Secado de cacao. a) granos de cacao después de 24 h de fermentación; b) granos de cacao después de 120 h de fermentación



Fuente: Autor.

7.8.4. Variables fisicoquímicas

- ✓ pH y acidez titulable

Para determinar el pH y la acidez titulable, se utilizaron 4 semillas, las cuales fueron tomadas del centro de la masa en fermentación. Luego se maceraron en 20 ml de agua destilada, la solución obtenida fue filtrada para determinar el pH con un potenciómetro marca Hanna® instruments. Luego se determinó la acidez titulable con NaOH 0.1N.

- ✓ Prueba de corte

Una muestra de 10 granos fermentados y secos de cada tratamiento fue tomada aleatoriamente en un tiempo fijo (24, 72, 120 y 168 h después de la inoculación).

Los granos se cortaron longitudinalmente para evaluar los cambios de color y agrietamiento dando una clasificación a partir de la norma técnica colombiana NTC 1252: granos bien fermentados, granos medianamente fermentados, granos insuficientemente fermentados y granos sobre fermentados. El porcentaje de granos bien fermentados fue calculado a través de la ecuación 3.

$$\% \text{ de granos bien fermentados} = \frac{\text{No de granos bien fermentados}}{\text{No total de granos evaluados}} \times 100$$

Ecuación 3. Porcentaje de granos bien fermentados.

✓ Índice de fermentación

Se pesaron 0.2 gramos de semilla de cacao seca y macerada, se mezcló con 20 ml de una solución de metanol (96%) y ácido clorhídrico (37%) en un relación 97:3 (metanol: ácido clorhídrico); se homogeneizó y se dejó reposar en el refrigerador a 4°C durante 19 horas. Luego la mezcla se centrifugó por 20 minutos a 2.310 rpm, y se tomó el sobrenadante para determinar la absorbancia a 460 y 530 nm (Nazaruddin et al., 2006).

7.8.5. Elaboración del licor del cacao

Se pesaron 200 g de cada muestra, se tostaron en una estufa marca Memmert, a temperatura de 120 ° C durante 40 minutos, luego se enfriaron y descascarillaron manualmente. El cacao se trituró en un procesador de alimentos marca KitchenAid® (St. Joseph, Michigan USA) hasta obtener el licor de cacao, el cual se guardó en refrigeración hasta el momento de las evaluaciones sensoriales (Ruíz et al., 2015).

7.8.6. Evaluación sensorial

Los licores de cacao se evaluaron a través de un análisis cuantitativo descriptivo mediante un panel de evaluación sensorial, compuesto por 5 personas. Se evaluaron muestras de licor de cada tratamiento, a cada tratamiento se le asignó dos códigos al azar. Se determinaron perfiles de sabores básicos (cacao, acidez, amargor y

astringencia), específicos (floral, frutal, nuez, verde y panela malta) y otros (defectos o adquiridos) usando una escala internacional de 0 a 10 (Tabla 6) (Ruíz et al., 2015). De cada licor se obtuvieron ocho valoraciones. Según los resultados, se seleccionó la mezcla potencial para mejorar la calidad de los granos de cacao.

Tabla 6. Escala con criterios de evaluación del árbitro sensorial

Escala	Criterio de evaluación
0	Ausente
1 a 2	Intensidad baja
3 a 5	Intensidad media
6 a 8	Intensidad alta
9 a 10	Intensidad muy alta

Fuente: (Ruíz et al., 2015).

7.9. PRUEBA A NIVEL DE CAMPO

La mezcla (2:1:2) fue valorada a nivel de macrofermentación en campo, para lo cual se utilizaron los aislados *Wickerhamomyces anomalus*, y *Debaryomyces hansenii*, *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus plantarum*, *Pediococcus acidilactici*, *Gluconobacter japonicus*, *Acetobacter tropicalis*, *Acetobacter pasteurianus*.

Para este estudio, se utilizaron 60 Kg de masa de cacao del material CCN51 en estado de madurez óptimo. Al cual se le realizó una limpieza con agua y jabón a la parte exterior del fruto, después las mazorcas fueron cortadas transversalmente para extraer la masa, esta fue homogeneizada y depositada en cajones de madera en cantidades iguales para cada réplica (10 Kg/repetición). Se establecieron dos tratamientos: el control masa de cacao sin adición de microorganismos y tratamiento al cual se le adicionó una mezcla de tres grupos microbianos en una relación 2:1:2 a saber; levaduras: bacterias ácido lácticas: bacterias ácido acéticas respectivamente.

Los microorganismos fueron cultivados en medio sólido, a las 96 horas de crecimiento la biomasa fue recuperada mediante solución salina estéril. La concentración de cada microorganismo fue estandarizada por espectrofotometría a 600 nm para levadura y 540 nm para bacterias aproximadamente a 5×10^6 unidades formadoras de colonia (UFC)/mL. Se preparó una suspensión de microorganismos compuesta de 120 mL de levaduras, 60 mL de BAL y 120 mL de BAA. Cada replica fue inoculada con 100 mL de la suspensión de microorganismos.

La masa de cacao por unidad experimental fue colocada en cajones de madera, dividida en partes iguales para realizar los volteos (Figura 15). Los volteos fueron realizados después del tercer día de fermentación para airear la masa de cacao (Horta, 2017). Los cajones de madera estaban provistos de orificios en el fondo para facilitar el drenaje de las exudaciones de la parte mucilaginosa de las almendras frescas de cacao (Arango, 2017). Se realizaron tres repeticiones por cada tratamiento. El seguimiento de las variables fisicoquímicas se realizó cada 24 h después de la inoculación hasta los 168 h. El análisis sensorial se determinó en la muestra de seis días de fermentación.

Figura 15. Fermentación de granos de cacao en cajón de madera



Fuente: autor.

7.10. DISEÑO EXPERIMENTAL Y ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los datos de selección de microorganismos fueron sometidos a pruebas de normalidad y homogeneidad de varianzas. De acuerdo con los resultados, se utilizó la prueba de Kruskal-Wallis con α de 0.05 para su análisis.

Los datos de la optimización de producción de pectinasas por *A. pullulans*, a pH (3.5, 4.5, 5.5, y 6.5) y tiempo de fermentación (24, 72, 120 y 168 h) cumplieron el supuesto de normalidad y de homocedasticidad, y fueron sometidos a un análisis de varianza simple, para determinar si existían diferencias estadísticamente significativas. Para la diferencia de medias, se utilizó la prueba de Tukey para determinar el mejor tratamiento.

En la prueba a nivel de campo, se utilizó un diseño completamente al azar, con dos tratamientos; el tratamiento control con masa de cacao sin inoculación y el tratamiento con la inoculación de la mezcla de microorganismos. Se establecieron tres repeticiones por tratamiento. Las hipótesis planteadas fueron las siguientes:

- ✓ Problema. Cacao con calidad organoléptica deficiente, presencia de microorganismos no deseables.
- ✓ Hipótesis nula (H_0): El inóculo de microorganismos adicionados no influye significativamente en la calidad del cacao. Siendo las características organolépticas similares del tratamiento control y el tratamiento con adición de microorganismos
- ✓ Hipótesis alternativa (H_a): El inóculo de microorganismos adicionados mejora la calidad del cacao. Siendo el tratamiento control estadísticamente diferente del tratamiento con adición de microorganismo.
- ✓ Variables dependientes: pH, acidez titulable, índice de fermentación, prueba de corte y análisis sensorial.
- ✓ Variables independientes: Mezcla de microorganismos y control.

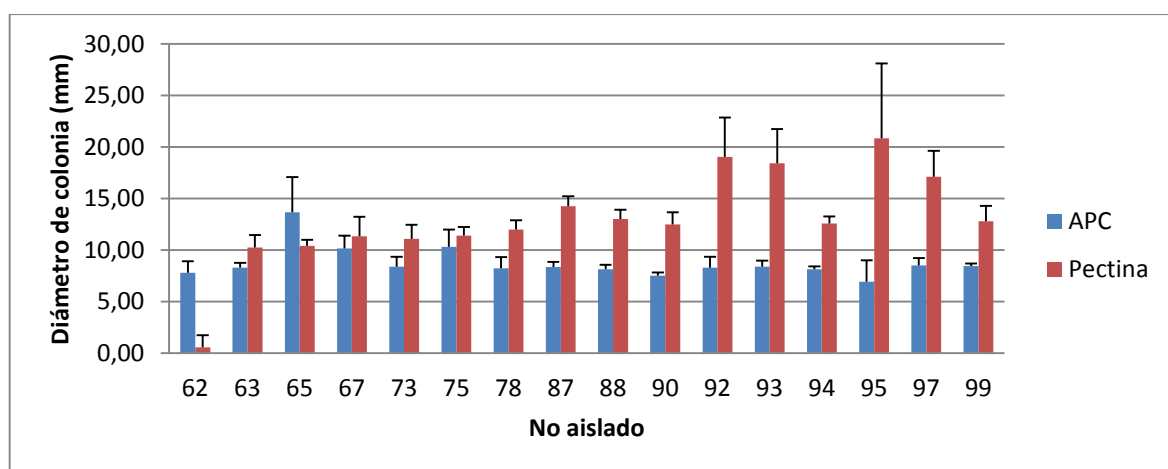
Los datos obtenidos fueron analizados utilizando el programa STATGRAPHICS Centurion XVI a un nivel de confianza del 95%.

8. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

8.1. SELECCIÓN DE LEVADURAS POR SU ACTIVIDAD PECTINOLÍTICA

Dieciséis aislados de levaduras (obtenidas de la fermentación de cacao) fueron evaluados por su actividad pectinolítica en medio sólido de agar pulpa de cacao (APC) y pectina; se calculó el diámetro de colonia de cada uno de los aislados (Anexo 1), todos los aislados mostraron crecimiento en estos dos medios de cultivos, se encontró que el aislado 65 (*Wickerhamomyces anomalus*) fue el que registró mayor crecimiento en medio APC, con un diámetro de 13.66 mm. Mientras que en medio de pectina, el aislado 95 (*Meyerozyma guilliermondii*) alcanzó el máximo diámetro de colonia con un valor de 20.82 mm. (Figura 16). Los datos de crecimiento no se distribuyeron normalmente según la prueba de Kolmogorov - Smirnov (Anexo 2). Por esta razón, se usó la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis, resultando un valor-P menor que 0.05 (Anexo 4), con lo que se demostró que el mayor crecimiento en medio APC y pectina resultó por el aislado 65 (*Wickerhamomyces anomalus*) y 95 (*Meyerozyma guilliermondii*), respectivamente (Anexos 5 y 6). Por consiguiente, se rechazó la H_0 de igualdad de medianas y se deduce que por lo menos una de las medianas es diferente.

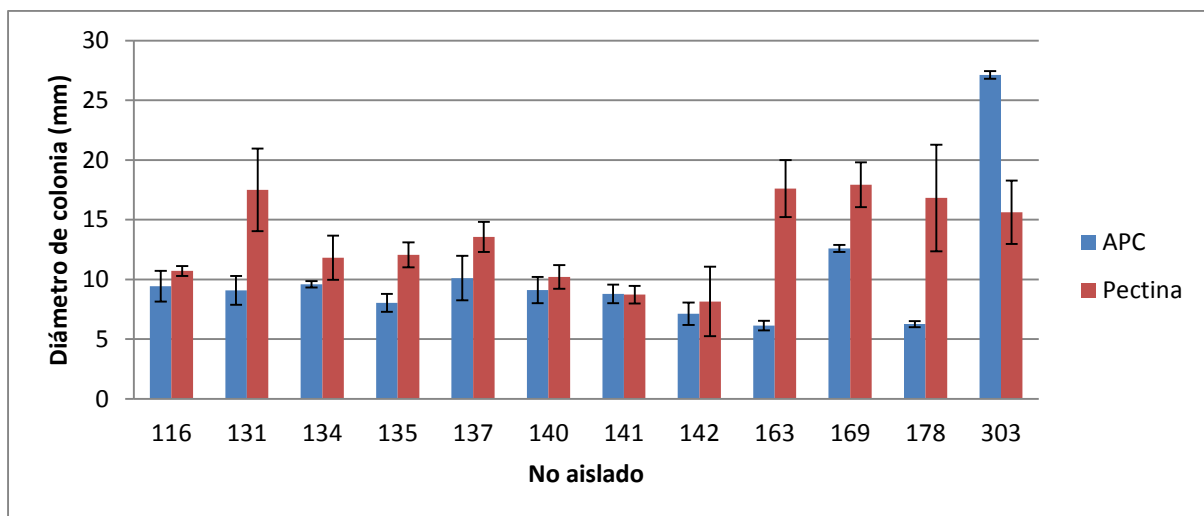
Figura 16. Evaluación de la actividad pectinolítica por levaduras obtenidas de la fermentación de cacao en medio sólido de agar pulpa de cacao (APC) y pectina



Las barras indican la desviación estándar (n=5).

En cuanto a la evaluación de la actividad pectinolítica de los 12 aislados de levaduras obtenidas de la filosfera de cacao, el máximo diámetro de colonia en medio de agar pulpa de cacao (APC) fue de 27.13 mm (Figura 17). El cual corresponde al aislado 303 (*Aureobasidium pullulans*). Mientras que en medio de pectina, el valor más alto fue de 17.92 mm por el aislado 169 (*Pichia kudriavzevii*). Se realizó la prueba de Kolmogorov-Smirnov dando como resultado que los datos no se distribuían normalmente en medio de APC pero si en medio de pectina (Anexo 8). Sin embargo, en ambos casos no se cumplió el supuesto de homogeneidad de varianzas (Anexo 9) Por tanto, se realizó una prueba de Kruskal-Wallis, obteniendo un valor $P < 0.05$ (Anexo 10). Con lo que se demostró nuevamente que el mayor crecimiento en medio APC por el aislado 303 (*Aureobasidium pullulans*) (Anexo 11) y en medio de pectina por el aislado 169 (*Pichia kudriavzevii*) (Anexo 12).

Figura 17. Evaluación de la actividad pectinolítica por aislados de levadura obtenidos de la filosfera de cacao en medio sólido de agar pulpa de cacao (APC) y pectina



Las barras indican la desviación estándar (n=5).

Entre 28 cepas de levaduras aisladas de la filosfera y fermentación de cacao, solo el aislado 303 (*Aureobasidium pullulans*) fue capaz de hidrolizar la pectina cítrica mediante ensayo en placa (Figura 18). El diámetro de halo alrededor de la colonia fue de 11.03 mm en medio de pectina (Anexo 13). Esta cepa es considerada como buena productora de enzimas despolimerizantes de pectina de acuerdo al criterio de clasificación usado por Soares et al. (1999). En el resto de los aislados, no se detectaron halos claros alrededor de la colonia después de la adición de la solución de yodo – yoduro de potasio.

Figura 18. Formación de halos claros alrededor de las colonias de *Aureobasidium pullulans* en medio de pectina cítrica



Fuente: autor.

Las levaduras son conocidas por producir pectinasas (Alimardani-Theuil et al., 2011), especialmente poligalacturonasas (Naga Padma et al., 2011). Las enzimas pectinolíticas de levaduras tienen un papel importante en la degradación y solubilización de la pulpa de cacao, lo cual permite la penetración de oxígeno en la masa de fermentación, dando lugar al crecimiento de bacterias aerobias de ácido acético (Visintin et al; 2016). Este trabajo tuvo como objetivo seleccionar levaduras por su actividad pectinolítica. Los aislados de levaduras comprendieron 5 especies. Siendo, el *Aureobasidium pullulans* la única especie que mostró actividad pectinolítica. Previamente, esta capacidad de producir pectinasas por dicha especie, fue reportado en los trabajos de Manachini et al. (1988), Biely et al. (1996), Galiotou-Panayotou et al. (1998), Merín et al. (2011, 2014), Molnárová et al. (2014), utilizando pectina como fuente de carbono, lo que sugiere que las pectinasas son inducibles por la adición de pectina.

La actividad pectinolítica del aislado 303 (*Aureobasidium pullulans*) en medio de pectina, presenta semejanza con los valores registrados por Merín et al. (2011), quienes reportaron diámetro de halos entre 11 y 21 mm a 12 °C. Sin embargo, es inferior con respecto a los diámetros de halos a 28 ° C, ya que estos se situaron entre 20 y 46 mm. Se considera baja la actividad pectinolítica de dicha especie, si tenemos en cuenta que la temperatura fue menos extrema (30°C). Pero, no el pH (4.0), dado que la literatura informa actividad de poligalacturonasa por *Aureobasidium pullulans* a diferentes valores de pH que van de 4 a 10 con un máximo alrededor de pH 5.0 (Bennamoun et al., 2016)

En el medio de agar pulpa de cacao (APC), el aislado 303 no mostró actividad pectinolítica. Esto probablemente se dio, por el hecho de que el *Aureobasidium pullulans* es una especie ubicua que se encuentra principalmente en la filosfera de muchas plantas de cultivo y en varias frutas tropicales (Deshpande, Rale, & Lynch, 1992). Diversos estudios sugieren, que hay mayor incidencia de especies pectinolíticas en ambientes pobres en nutrientes como la superficie de la uva, suelos y ecosistemas glaciales (Merín et al., 2015; Naga Padma et al., 2011; Nakagawa et al., 2004; Turchetti et al., 2008). Asimismo, el sistema pectinolítico del *Aureobasidium pullulans* es inducible en condiciones de inanición de carbono (Biely et al., 1996). Dado que, la pulpa de cacao es rica en azúcares fermentables como glucosa, fructosa y sacarosa (Ardhana & Fleet, 2003). Además, es un medio que contiene pectina (Schwan & Wheals, 2004). Esta abundancia de azúcares en el medio APC pudo haber reprimido la secreción de pectinasas.

La actividad pectinolítica no se demostró en ninguna de las levaduras aisladas de la fermentación de cacao bajo el método utilizado. Sin embargo, aunque no se detectaron formación de halos, todos los aislados crecieron en medio de pectina y en el medio APC con formación de biomasa, lo cual indica utilización de nutrientes de los medios de cultivo; tanto de recurso de carbono (pectina) como el recurso de nitrógeno (extracto de levadura). De igual manera, la pulpa de cacao es rica en azúcares y otros nutrientes que permiten el crecimiento de microorganismos con características especiales como las levadura. En diversos estudios se indica la producción de pectinasas por levaduras aisladas de la fermentación de cacao, Schwan & Rose. (1994), reportaron que una cepa de *Kluyveromyces marxianus*,

aislada de una fermentación de cacao en Brasil, secreta una endopoligalacturona (PG) cuando creció en condiciones anaeróbicas auto inducidas. La secreción de esta enzima disminuyó cuando la concentración de glucosa era más de 10% (p/v). Lo que sugiere que la glucosa parece actuar como un represor de catabolitos. Igualmente Schwan et al. (1997), encontraron actividad de pectinasa extracelular en cuatro cepas de levaduras aisladas de la fermentación de cacao en Brasil. Las cuales fueron *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida rugopelliculosa*, *Kluyveromyces thermotolerans* y *Kluyveromyces marxianus*. Esta última fue la levadura más activa con diámetro de halo de 30 mm. También, se ha reportado actividad pectinolítica en levaduras aisladas de la fermentación de cacao en África occidental. Entre las especies encontradas están: *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida ethanolica*, *Hanseanispora guilliermondii* y *Schizosaccharomyces pombe* (Visintin et al., 2016). La diferencia en el desarrollo de los aislados en los dos medios de cultivos indica que los aislados de las diferentes especies evaluadas responden en forma diferente; siendo importante entonces, el proceso de selección de los microorganismos para obtener los potenciales.

Las levaduras aisladas de la fermentación de cacao en tres regiones de Colombia, correspondieron a las especies *Debaryomyces hansenii*, *Meyerozyma guilliermondii* y *Wickerhamomyces anomalus*. La actividad pectinolítica de dichas especies no se detectaron en medios de pectina y APC. Esto es concordante con los hallazgos de Sanchez et al. (1984), quien descubrió que las levaduras pectinolíticas aisladas de la levadura de la fermentación de cacao no pudieron producir poligalacturonasa en medio de pectina no suplementado con glucosa. Martos et al. (2013), no detectó actividad pectinolítica por la especie *Wickerhamomyces anomalus* en agar base nitrogenada de levadura (YNB) con 5.0 (g/L) de glucosa ni con 5.0 (g/L) de pectina como única fuente de carbono. Sin embargo, sí se encontró una alta actividad pectinolítica utilizando agar YNB con 5 (g/L) de glucosa y 2.5 (g/L) de pectina o 5 (g/L) de ácido poligalacturónico. Dando como resultado halos entre 27 y 40 mm de diámetro. Por esta razón, se infiere que la levadura *Wickerhamomyces anomalus* requiere glucosa como fuente de carbono y energía y pectina cítrica o ácido poligalacturónico para inducir la síntesis de la enzima.

Avallone et al. (2002), informó que la especie *Meyerozyma guilliermondii* (*Candida guilliermondii*) no tiene capacidad para producir enzimas endopeptolíticas (Poligalacturonasas, Pectín liasa y Pectato liasa) a partir de pruebas de reducción de viscosidad. Esto fue confirmado por Da Silva et al. (2005), quien no encontró actividad de pectín liasa en placa, empleando medio mineral con pectina. Pero, si detectó actividad de poligalacturonasa en medio mineral con ácido poligalacturónico suplementado con glucosa o galactosa. Esta diferencia en la actividad, se debe a que no hay una correlación directa entre la reducción de viscosidad y el número de enlaces hidrolizados (Alimardani-Theuil et al., 2011)

Por otro lado, la actividad pectinolítica de *Debaryomyces hansenii* no fue detectada en un estudio hecho por Charoenchai et al. (1997), utilizando un medio que contiene: ácido poligalacturónico (12.5 g/L), fosfato de potasio (6.8 g/L), base nitrogenada de levadura (6.7g/L), glucosa (10 g/L) y agar (20 g/L). Además, en medio líquido de medio de YNB (6.7 g/L), glucosa (10 g/L) y pectina (10 g/L) no se encontró actividad de pectín liasa, pectinesterasa ni de poligalacturonasa. Esto es corroborado por Da Silva et al. (2005), quien no detectó actividad de pectín liasa en medio mineral con pectina, ni actividad de poligalacturonasa en medio con ácido poligalacturónico suplementado con glucosa. En cambio, si hubo actividad cuando la glucosa fue sustituida por galactosa. Se ha informado que la galactosa fue mejor fuente de carbono que la glucosa con cepas de *Saccharomyces cerevisiae* que fueron genéticamente modificadas para producir poligalacturonasa (Jia & Wheals, 2000).

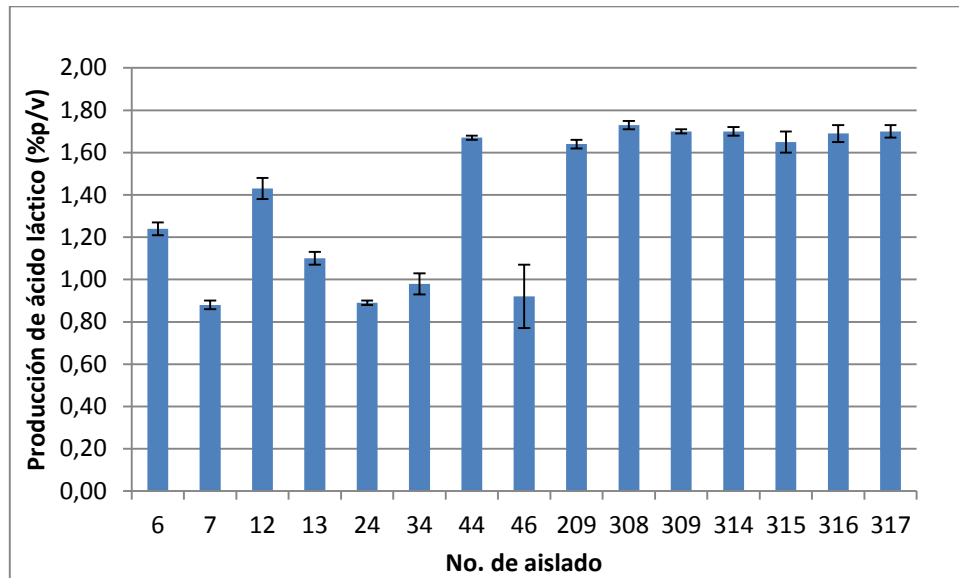
Para la selección de levaduras que se utilizaron como inóculo en la fermentación de cacao, se tuvieron en cuenta dos criterios, el primero fue seleccionar levaduras que producen el diámetro de halo más grande y el segundo criterio fue aquellas que produjeran el tamaño de colonia más grande. No se seleccionó la especie *Aureobasidium pullulans* porque no hay reportes de que haya sido aislada en la fermentación de cacao. Sin embargo, se utilizó para la optimización de producción de pectinasas. No se seleccionó la especie *Meyerozyma guilliermondii* porque hay antecedentes que indican que pueden causar infecciones al ser humano (Cebeci Güler, Tosun, & Aydin, 2017). Teniendo en cuenta los resultados de crecimiento, se eligió el aislado 65 (*Wickerhamomyces anomalus*) porque exhibió el mayor

crecimiento en medio de agar pulpa de cacao. Además, por ser reportada como una de las especies más importantes en la formación de compuestos aromáticos específicos del cacao (Koné et al., 2016). También, se seleccionó el aislado 67 (*Debaryomyces hansenii*) por su buen crecimiento en medio APC y por sobresalir después de las cepas de *Meyerozyma guilliermondii* en medio de pectina.

8.2. SELECCIÓN DE BACTERIAS ÁCIDO LÁCTICAS (BAL) POR SU CAPACIDAD DE PRODUCCIÓN DE ÁCIDO

Quince cepas de bacterias ácido lácticas (BAL) fueron evaluadas por su capacidad para producir ácido láctico en medio MRS. Se calculó el valor promedio de producción de ácido de cada uno de los aislados (Anexo 14). Todos los aislados exhibieron producción de ácido láctico (Figura 19); en este sentido, sobresalieron de los aislados 308, 309 y 314 de la especie *Lactobacillus plantarum*. Los datos de producción de ácido láctico no se distribuyeron normalmente de acuerdo a la prueba de Kolmogorov – Smirnov (Anexo 15). Tampoco cumplieron el supuesto de homogeneidad de varianzas, según la prueba de Levene (Anexo 16). Por esta razón, se empleó la prueba no paramétrica de Kruskal – Wallis, resultando un valor – p por debajo de 0.05 (Anexo 17), la cual arrojó mayor producción de ácido por el aislado 308.

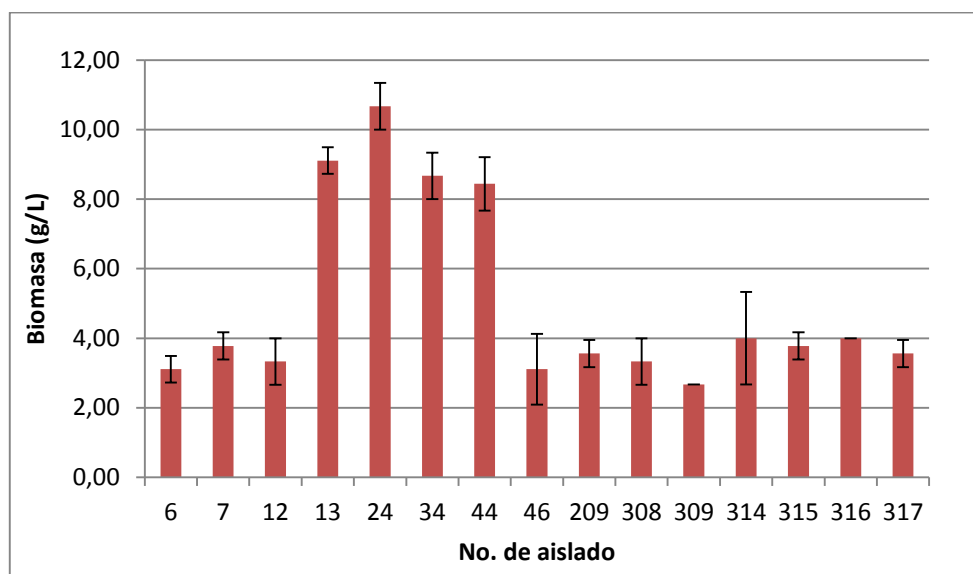
Figura 19. Evaluación de la producción de ácido por bacterias ácido lácticas (BAL) obtenidas de la fermentación de cacao



Las barras indican la desviación estándar (n=3).

En cuanto a la biomasa (g/L) de las bacterias ácido lácticas (BAL), se observó un mayor crecimiento en el aislado 24 (*Lactobacillus brevis*) después de 5 días de fermentación (Figura 20). Se utilizó la prueba de Kolmogorov – Smirnov para determinar si la biomasa tenía una distribución normal. Se obtuvo un valor- p menor a 0.05 (Anexo 15), con lo cual se rechazó la idea que la biomasa proviene de una normal con 95% de confianza. Se aplicó la prueba no paramétrica de Kruskal – Wallis, resultado un valor – p menor a 0.05 (Anexo 17), con la cual se corroboró mayor producción de biomasa por el aislado 24 (Anexo 19).

Figura 20. Evaluación de la producción de biomasa (g/L) por bacterias ácido lácticas (BAL) obtenidas de la fermentación de cacao



Las barras indican la desviación estándar (n=3).

Las bacterias ácido lácticas (BAL) tienen un rol importante durante la fermentación de cacao. Ya que fermentan azúcares de pulpa, principalmente glucosa y fructosa, a ácido láctico y cantidades menores de etanol y ácido acético. Además, utilizan el ácido cítrico dentro de la pulpa para producir ácido láctico, ácido acético, acetaldehído, diacetilo y acetoina (Ho, Zhao, & Fleet, 2015). La asimilación del ácido cítrico conduce a una disminución general de la acidez y un aumento en el valor de pH del grano de cacao (Schwan & Wheals, 2004). Esto es importante para activar las diversas enzimas endógenas necesarias para el desarrollo de precursores del sabor del chocolate (Ho et al., 2015; Schwan & Wheals, 2004).

La especie *Lactobacillus plantarum* se ha encontrado profusamente en el proceso de fermentación de cacao en países como Brasil (Magalhães da Veiga Moreira et al., 2016; Papalexandratou et al., 2011b), Ecuador (Papalexandratou, Falony, et al., 2011), Costa de marfil (Visintin et al., 2016), Indonesia (Ardhana & Fleet, 2003), Ghana (Camu et al., 2007; Nielsen et al., 2007), Nigeria (Kostinek et al., 2008), Republica Dominicana (Lagunes Gálvez et al., 2007) y Australia (Ho et al., 2015). Sin duda alguna, la especie *Lactobacillus plantarum* está bien adaptada al ecosistema de cacao, con capacidad de responder a los cambios en temperatura,

concentración de etanol y tensiones acidas encontradas en la masa de cacao en fermentación (Ouattara et al., 2017).

Por otro lado, varios autores han utilizado la bacteria *Lactobacillus plantarum* como cultivo iniciador en combinación con otras especies. Entre ellos, Sandhya et al. (2016), informaron mayor producción de ácido láctico en la fermentación inoculada que la fermentación natural. Similarmente, Moreira et al. (2017), encontraron mayor concentración de ácido láctico después de 144 h en la pulpa de cacao de la fermentación inoculada que en la pulpa de la fermentación natural.

En nuestro estudio, la especie *Lactobacillus plantarum* mostró la mayor producción de ácido láctico, con 1.73 % p/v (17.30 g/L de ácido láctico). Lo cual es mayor en comparación al trabajo de Georgieva et al. (2009), quienes informaron que la cepa de *Lactobacillus plantarum* produjo 13.68 g/L de ácido láctico en caldo MRS con glucosa (20g/L). La producción de ácido láctico de esta cepa es superior al obtenido por Jurado et al. (2013), quienes reportaron una producción de ácido láctico en medio MRS de 9.94 g/L y 10.93 g/L a las 24 h, por *Lactobacillus plantarum* 1 H1 y *Lactobacillus plantarum* 1 H2, respectivamente.

Jurado et al. (2013), encontraron la máxima producción a las 18 horas de fermentación, con 17.75 g/L por la cepa *Lactobacillus plantarum* 1 H1 y 17.09 g/L a las 12 horas de fermentación por *Lactobacillus plantarum* 1 H2. Además del tiempo de fermentación, el medio de cultivo es un factor importante para la producción de ácido láctico (García, Arrázola, & Durango, 2010). En el mismo estudio de Jurado et al. (2013), se evaluó la cinética de crecimiento de *Lactobacillus plantarum* en cuatro medios de cultivos. Los mejores resultados se encontraron en el medio constituido de 10 g/L azúcar blanco, 15 g/L leche de soya, 150 g/L suero de leche y 15 g/L salvado de trigo. En el cual se alcanzó la mayor producción de ácido láctico con 21.75 g/L a las 24 h y 23.48 g/L a las 18 h por *Lactobacillus plantarum* 1 H1 y *Lactobacillus plantarum* 1 H2, respectivamente.

Pediococcus acidilactici fue la segunda especie que mostró una buena producción de ácido láctico. La cepa 44 (*Pediococcus acidilactici*) produjo 1.67 % p/v (16.70 g/L de ácido láctico), lo cual es muy superior en comparación con los hallazgos de Peev et al. (2017), en el que dos aislados de *Pediococcus acidilactici* produjeron 0.813 g/L y 0.995 g/L de ácido láctico en caldo MRS con de glucosa al 5%. Esta baja concentración puede explicarse, porque altas concentraciones de glucosa en el medio de crecimiento podrían conducir a la inhibición en el crecimiento bacteriano (represión de la glucosa) (Nakano, Ugwu, & Tokiwa, 2012).

Las otras especies de bacterias ácido lácticas pueden considerarse como microorganismos específicos, porque no se encuentran en las fermentaciones de cacao en todo el mundo. La especie *Lactobacillus rhanmosus* se ha encontrado en fermentaciones de cacao en Brasil (Moreira et al; 2013) y en Costa de marfil (Visintin et al., 2016), *Lactobacillus brevis* en República dominicana (Lagunes Gálvez et al., 2007) y Nigeria (Kostinek et al., 2008), *Leuconostoc mesenteroides* en Ghana (Camu et al., 2007) y *Lactobacillus farraginis* en Ecuador (Papalexandratou, Falony, et al., 2011). Estas especies exhibieron una baja producción de ácido láctico. Esto podría explicarse, por la falta de vitaminas en el medio de fermentación de nuestro experimento (Peev et al., 2017).

El aislado 209 (*Lactobacillus rhanmosus*) produjo 16.40 g/L de ácido láctico y 3.56 g/L de biomasa. Estos resultados fueron diferentes a los obtenidos por Bernardo et al. (2016), quienes obtuvieron una producción de ácido láctico de 57.00 g/L y 4.79 g/L de biomasa después de 48 h de fermentación a 37 °C, 200 rpm y pH 6.20. En el trabajo de Chemeli et al. (2015), la fermentación en lote de *Lactobacillus rhanmosus* ATCC 10863 se realizó con 27.6 g/L de sacarosa y 3.0 g/L de extracto de levadura. La mayor producción de ácido láctico se alcanzó a las 14 horas, con 16.5 g/L.

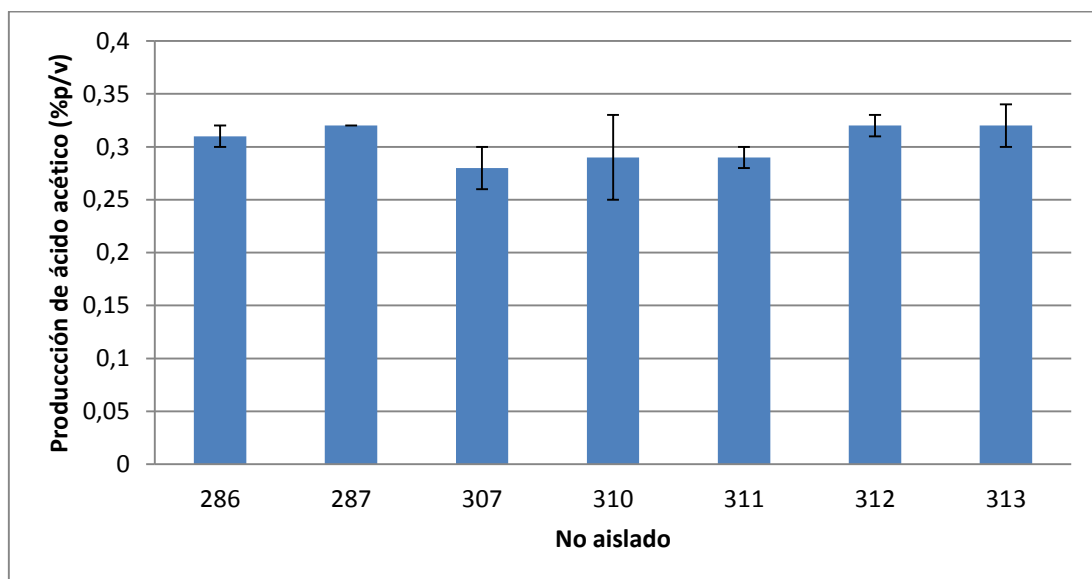
La bacteria *Lactobacillus brevis* fue la de mayor producción de biomasa. El aislado 24 (*Lactobacillus brevis*) produjo 10.67 g/L de biomasa, lo cual es mayor comparado con lo reportado por Nandan et al. (2011), quien informó 2.45 g/L de biomasa de *Lactobacillus brevis* después de 24 h de fermentación. Al mismo tiempo, el autor obtuvo la máxima producción de ácido láctico con una concentración de 20.42 g/L.

Para la producción del cultivo iniciador, se seleccionaron los aislados 314 (*Lactobacillus plantarum*), 44 (*Pediococcus acidilactici*) por su buena capacidad de producción de ácido láctico y el aislado 24 (*Lactobacillus brevis*) por ser la especie de mayor producción de biomasa.

8.3. SELECCIÓN DE BACTERIAS ÁCIDO ACÉTICAS (BAA) POR SU CAPACIDAD DE PRODUCCIÓN DE ÁCIDO.

Siete cepas de bacterias ácido acéticas (BAA) fueron evaluadas por su capacidad para producir ácido acético. Se encontró la mayor producción de ácido en el aislado 287 (*Gluconobacter japonicus*), 312 (*Acetobacter tropicalis*) y 313 (*Acetobacter malorum*) (Figura 21). Los datos de producción de ácido acético se distribuyeron normalmente según la prueba de Shapiro – Wilks (Anexo 21). Sin embargo, no se ajustaron al supuesto de homogeneidad de varianzas de acuerdo a la prueba de Levene (Anexo 22). Por tal razón, se utilizó la prueba no paramétrica de Kruskal – Wallis, resultando un valor – P mayor a 0.05 (Anexo 23). Lo cual indica, que no existe una diferencia estadísticamente significativa entre las medianas con un nivel del 95% de confianza.

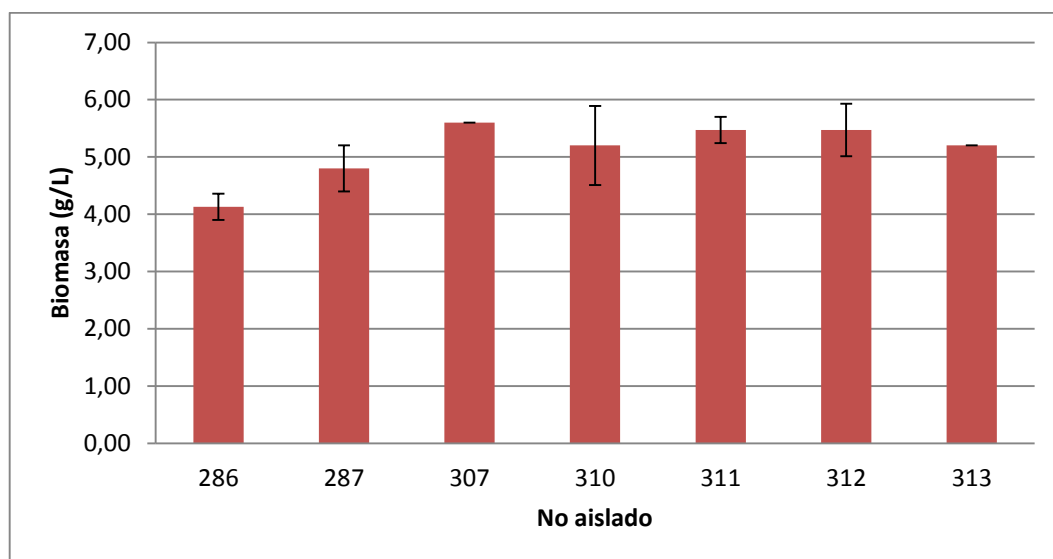
Figura 21. Evaluación de producción de ácido por bacterias ácido acéticas (BAA) obtenidas de la fermentación de cacao



Las barras indican la desviación estándar (n=3).

Respecto a la producción de biomasa, el aislado 307 (*Acetobacter tropicalis*) fue el de mayor producción, con un valor de 5.60 g/L de biomasa (Figura 11). Los datos no tenían una distribución normal de acuerdo a la prueba de Shapiro – Wilks (Anexo 21). Tampoco, cumplieron el supuesto de homogeneidad de varianza según la prueba de Levene (Anexo 22). Por lo cual, se aplicó la prueba de Kruskal – Wallis, arrojando un valor – p menor a 0.05 (Anexo 23). Lo cual indica, que existe una diferencia estadísticamente significativa entre las medianas con un nivel del 95% de confianza.

Figura 22. Evaluación de producción de biomasa por bacterias ácido acéticas (BAA) obtenidas de la fermentación de cacao



Las barras indican la desviación estándar (n=3).

Las bacterias ácido acéticas (BAA) dominan la fase aeróbica de la fermentación de cacao (Lefeber et al., 2010). Estas bacterias oxidan el etanol producido previamente por las levaduras en ácido acético a través de un proceso exotérmico (Nielsen et al., 2007). Este ácido se difunde en los cotiledones, acidificando los granos de cacao y activando enzimas hidrolíticas internas (Soumahoro, Ouattara, et al., 2015). Parte de este ácido se volatiliza y otra parte penetra en la testa (aproximadamente 2%) y es responsable de causar la muerte del embrión (Schwan & Wheals, 2004). Esto conduce a la formación de moléculas precursoras que son necesarias para el desarrollo de un aroma, sabor y color característico de los granos (Soumahoro, Goualie, et al., 2015).

Los aislados 287 (*Gluconobacter japonicus*), 312 (*Acetobacter tropicalis*) y 313 (*Acetobacter malorum*) presentaron igual producción de ácido, cuyo valor fue de 0.32% (p/v) de ácido acético. *Gluconobacter japonicus* ha sido aislado de la uvas sanas y del mosto de uva (Navarro et al., 2013; Valera et al., 2011). *Acetobacter malorum* se aisló de la fermentación de cacao en Brasil y Ghana (Nielsen et al., 2007; Pereira et al., 2012). La bacteria *Acetobacter tropicalis* fue la especie más dominante en fermentaciones de cacao en Brasil, lo cual puede explicarse por su resistencia al ácido y al calor (Pereira et al., 2012). Romero et al. (2012), informaron una producción de 2.5% (v/v) de ácido acético por la bacteria *Acetobacter tropicalis* ITV61 en medio de patata suplementado con 4% (v/v) de etanol. Además, este aislado pudo crecer a 7% de etanol y exhibió tolerancia al 1% de (v/v) de ácido acético.

El aislado 311 (*Acetobacter pasteurianus*) produjo 0.29% (2.9 g/L de ácido acético), este valor es bajo comparado con el estudio de Soumahoro et al. (2015), en el que el aislado 123 D (*Acetobacter pasteurianus*) mostró una producción de 13.9 g/L de ácido acético en caldo Hestrin – Schramm (HS) libre de calcio, suplementado con MgSO₄ 0.01% y NaHPO₄ 0.27%, para promover la producción de ácido. Asimismo, esta cepa presentó la máxima producción de ácido acético en medio sólido de caldo HS con etanol al 8% (Soumahoro, Goualie, et al., 2015). Por otra parte, *Acetobacter pasteurianus* es la especie más prevalente en la fermentación espontánea de granos de cacao, debido a su capacidad de oxidación de etanol, manitol y ácido láctico y su tolerancia al ácido y al calor (De Vuyst & Weckx, 2016).

Los aislados 287 (*Gluconobacter japonicus*), 310 (*Acetobacter tropicalis*) y 311 (*Acetobacter pasteurianus*) fueron seleccionados para la producción del inóculo, utilizado para mejorar la fermentación de cacao.

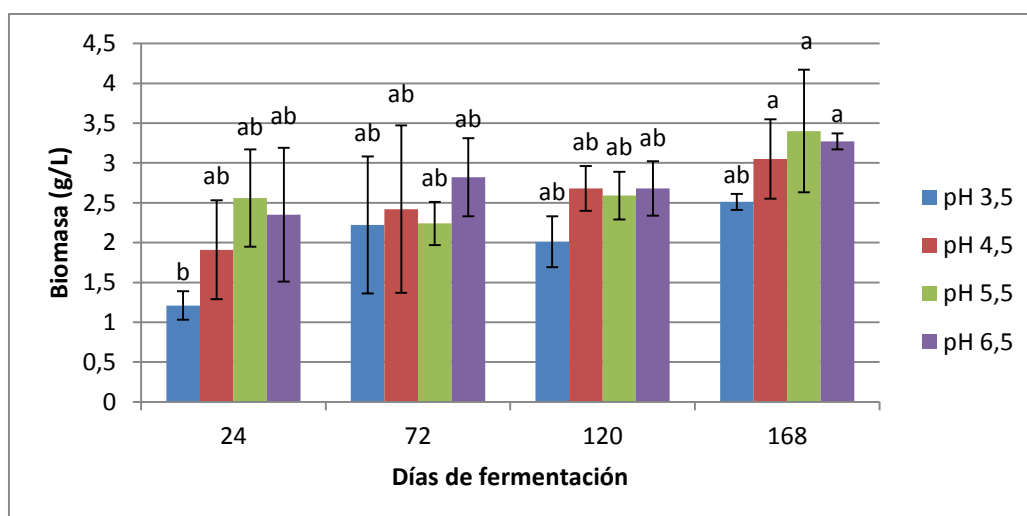
8.4. OPTIMIZACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE PECTINASAS POR *Aureobasidium pullulans* AISLADO DE LA FILOSFERA DE CACAO

8.4.1. Producción de biomasa

La Figura 23 muestra la evolución de la biomasa de *A. pullulans* en el transcurso de la fermentación, utilizando diferentes pH en el medio de pectina. Durante las primera 24 h de fermentación, se observó mayor producción de biomasa (2.56±0.61 g/L) a

pH 5.5 y menor biomasa (1.21 ± 0.18 g/L) a pH 3.5. Después de 72 h de fermentación, se presentó un aumento en la biomasa a pH 3.5, 4.5 y 6.5. Siendo este último, el de mayor biomasa (2.82 ± 0.49 g/L). A las 120 h de fermentación hubo un incremento en la biomasa a pH 4.5 y 5.5. Al final del proceso de fermentación (168 h), se obtuvo la máxima producción de biomasa (3.40 ± 0.77 g/L) a pH 5.5. Este resultado es consistente con el trabajo de Youssef et al. (1998) en donde la alta concentración de biomasa (14.2 g/L) por *A. pullulans* fue encontrada con un pH inicial de 5.5 en medio que contenía aceite de oliva (2.5% v/v) y sacarosa (6.0% p/v) como fuentes de carbono. Rama Krishna et al (2016), evaluó el efecto del pH inicial (de 3.0 a 7.0) en la producción de biomasa por *A. pullulans* MTCC 2195, utilizando como medio jugo concentrado de caña de azúcar. La producción de biomasa aumentó cuando el pH varió de 3.0 a 5.0 y disminuyó a pH 7.0. En otro estudio Srikanth et al. (2014) optimizaron la producción de biomasa por *A. pullulans* MTCC 2195, utilizando cuatro factores: melaza, KH_2PO_4 , extracto de levadura y pH. El pH óptimo se obtuvo a pH de 6.4, cuando el pH del medio se incrementó a pH 7.5 la biomasa disminuyó. Esto indica que el pH ácido favorece la producción de biomasa de *A. pullulans*. Los resultados sugieren que la mayor producción de biomasa se obtiene en un rango de pH de 4.5 a 6.5, a las 168 h.

Figura 23. Efecto del pH y tiempo de fermentación (h) en la producción de biomasa por *A. pullulans*



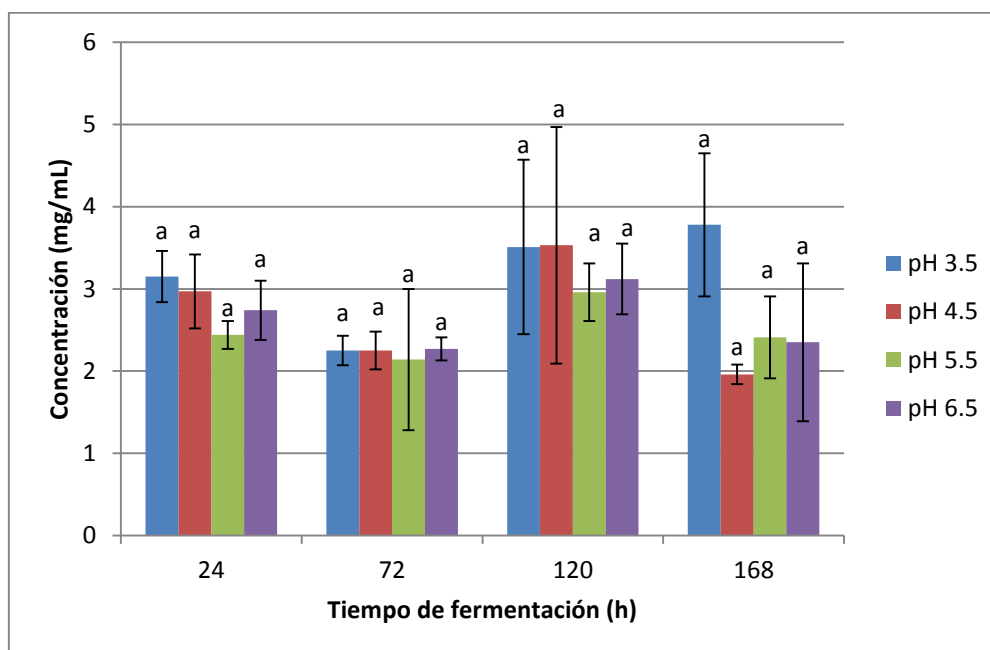
Las barras indican la desviación estándar (n=3). Medias con una letra común no son significativamente diferentes (Prueba Tukey, $P > 0.05$).

El análisis de varianza indicó que existen diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) en la biomasa de los tratamientos, con un nivel de confianza del 95% (Anexo 28). Lo que demuestra, que el pH y tiempo de fermentación (h) afecta la producción de biomasa de *A. pullulans*.

8.4.2. Concentración de pectinasas

El análisis de varianza mostró diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) en la concentración de pectinasas entre tratamientos, con un nivel de confianza del 95% (Anexo 33). La prueba de Tukey reveló que no existen diferencias significativas entre cualquier par de medias, con nivel del 95% de confianza (Anexo 34). Sin embargo, la mayor concentración de pectinasas (3.78 ± 0.87 mg/mL) se registró a las 168 h de fermentación con un pH de 3.5 (Figura 24).

Figura 24. Efecto del pH y tiempo de fermentación (h) en la concentración de pectinasas (mg/mL)

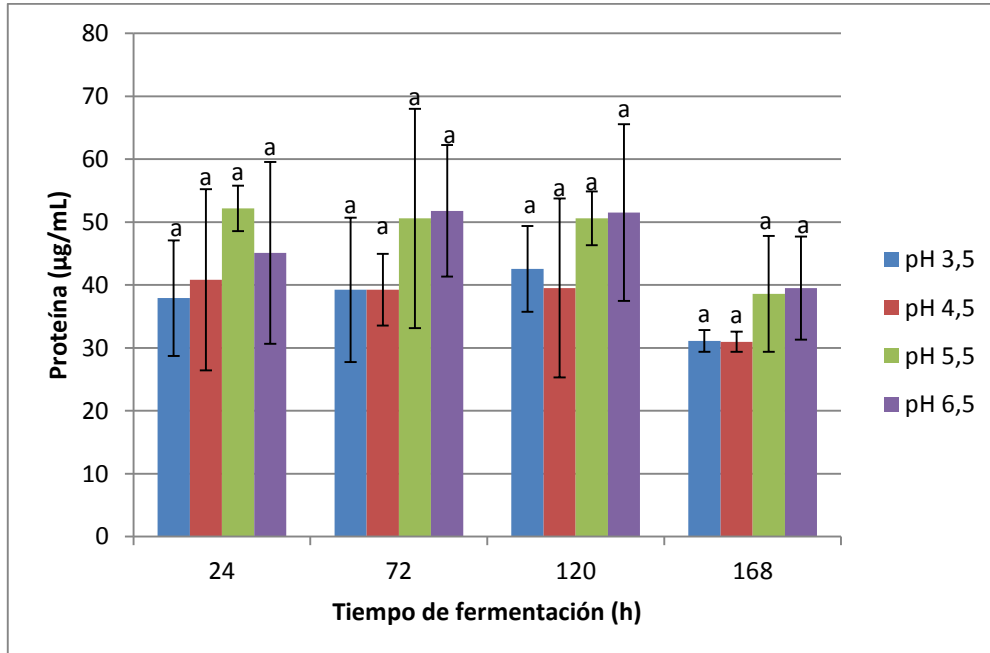


Las barras indican la desviación estándar ($n=3$). Medias con una letra común no son significativamente diferentes (Prueba Tukey, $P > 0.05$).

8.4.3. Contenido de proteína

El contenido de proteína no evidenció diferencias significativas ($p > 0.05$) entre tratamientos (Anexo 38). En la Figura 25 se muestra la variación del contenido de proteína durante la fermentación. El máximo contenido de proteína ($52.19 \mu\text{g/mL}$) fue obtenido a la 24 h con pH de 5.5. Taragano. (2000) informó que la curva de crecimiento del microorganismo se correlaciona en forma directa con el consumo de proteínas. Es decir, que una alta producción de biomasa coincide con un bajo contenido de proteína. Lo cual se observó en nuestro estudio a las 168 h de fermentación. Sin embargo, se esperaba que la máxima producción de biomasa coincidiera con el mínimo contenido de proteína. Este resultado es probablemente debido a la síntesis de enzimas extracelulares luego del consumo de proteínas proporcionadas por la peptona de caseína, que hizo que el contenido de proteína no decayera.

Figura 25. Efecto del pH y tiempo de fermentación (h) en el contenido de proteína ($\mu\text{g/mL}$) en el medio de fermentación

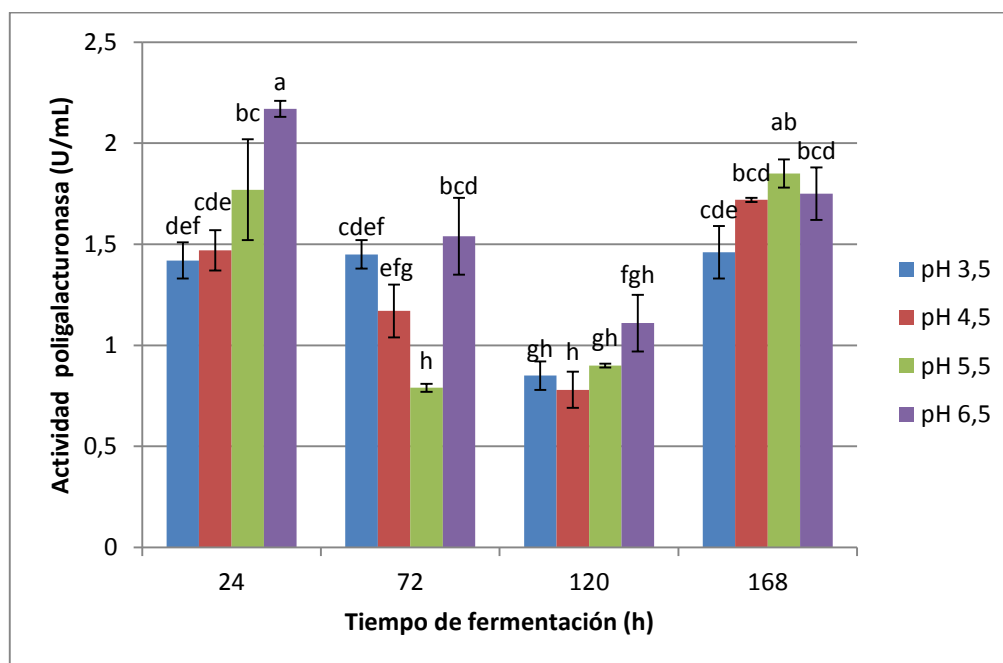


Las barras indican la desviación estándar ($n=3$). Medias con una letra común no son significativamente diferentes (Prueba Tukey, $P > 0.05$).

8.4.4. Actividad de poligacturonasa (PG)

La actividad de poligalacturonasa (PG) mostró diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) entre tratamientos (Anexo 43). La actividad de PG (2.17 ± 0.04 U/mL) fue máxima con pH de 6.5 a las 24 h de fermentación (Figura 26). En este trabajo, se observó una disminución en la actividad de PG a las 120 h de fermentación con pH 3.5, 4.5 y 6.5. Que luego aumento al final del proceso de fermentación (168 h). Esto dio lugar a la formación de dos fases en la fermentación, la primera comprendida entre 24-120 h y la segunda fase entre 120-168 h de fermentación. Un comportamiento similar fue encontrado por Taragano. (2000) con una primera fase entre las 48 – 120 h de fermentación, con una caída al final en la actividad de PG posiblemente por desestabilización o degradación. La segunda fase se presentó después de 120 h de fermentación, con un aumento en la actividad de PG. Según este autor, por dos isoformas que se sintetizan en función de distintas condiciones de crecimientos.

Figura 26. Efecto del pH y tiempo de fermentación (h) en la actividad de poligalacturonasa (PG) de *A. pullulans*



Las barras indican la desviación estándar (n=3). Medias con una letra común no son significativamente diferentes (Prueba Tukey, $P > 0.05$).

Merín et al. (2011) evaluaron la actividad pectinolítica de cepas de *A. pullulans* aisladas de uvas de vino, bajo condiciones de pH (3.5) y temperatura (12 y 28 °C). Las cepas R-22 y Ch-24 exhibieron las actividades pectinolíticas más altas (0.751 y 0.696 U/mL, respectivamente) a 12 °C. Mientras que a 28 °C, las levaduras mostraron actividades pectinolíticas entre 0.673 y 1.698 U/mL. En nuestro estudio, la actividad de PG bajo condiciones de pH 3.5 y 30°C estuvo entre 0.85 y 1.46 U/mL. Se puede inferir que la temperatura tiene un efecto importante en la actividad pectinolítica. Además, los resultados de este estudio son inferiores comparado con la actividad enzimática a 28 °C. Puesto que, las condiciones fueron menos extremas, al estar más cerca a la temperatura óptima (37 °C) para la actividad pectinolítica de *A. pullulans* (Deshpande et al., 1992)

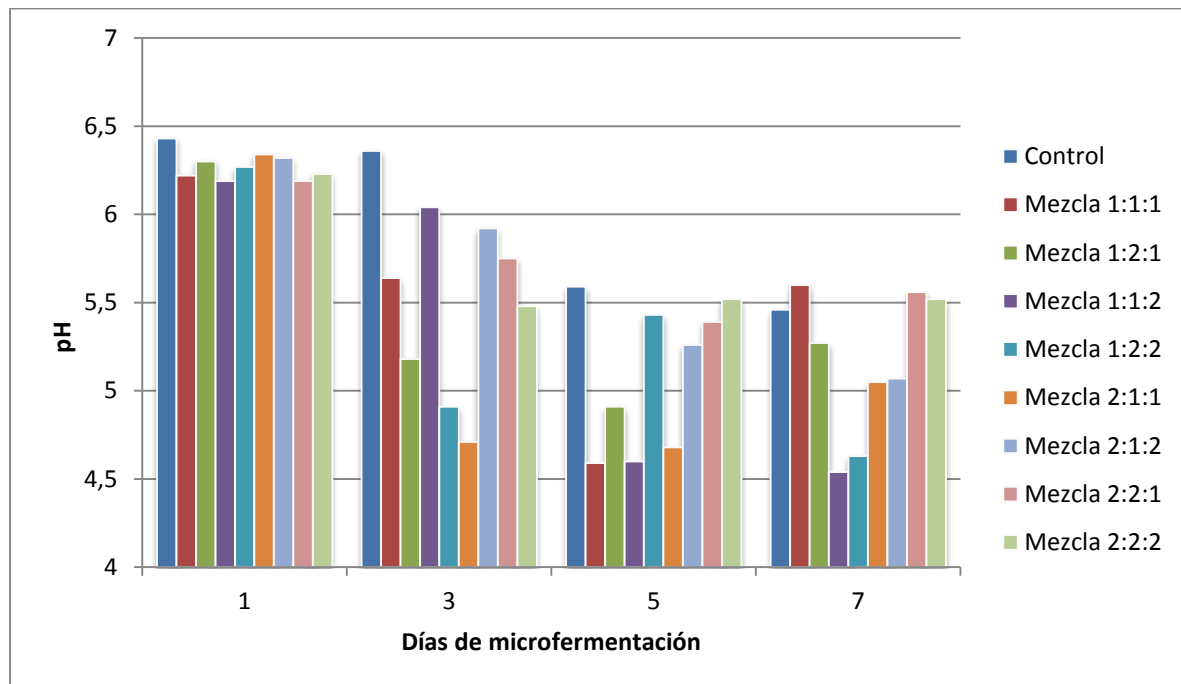
Bennamoun et al. (2016) informaron la máxima actividad de PG por *A. pullulans* a pH de 5.0. La actividad mínima se ha encontrado a pH entre pH 7.0 y 8.0 (Manachini et al., 1988). En el presente estudio, se produjo la mayor actividad de PG cuando el pH inicial de medio se situó entre 5.5 y 6.5.

8.5. EVALUACIÓN DE MEZCLAS DE MICROORGANISMOS SOBRE LAS CARACTERÍSTICAS FÍSICOQUÍMICAS Y SENSORIALES DEL GRANO DE CACAO

8.5.1. Cambios en el pH del grano de cacao durante la microfermentación por el efecto de diferentes mezclas microorganismos

El pH de los granos de cacao durante la fermentación es crucial ya que determina la calidad fermentativa de los granos (Afoakwa et al., 2011). Según Afoakwa et al. (2008), el pH de los granos bien fermentados está entre 4.75 y 5.19. En cambio, los granos mal fermentados tienen un pH de 5.5 – 5.8. De la misma manera cuando el pH de los granos es menor a 4.5 habrá una reducción de los precursores de sabor y un producto sobre ácido (Saltini et al., 2013).

Figura 27. Cambios en el pH del grano de cacao durante la microfermentación por el efecto de diferentes mezclas de microorganismos



En esta investigación, el pH del cotiledón en el control fue de 6.43 en el día 1 de la microfermentación, que luego disminuyó a pH 5.46 después de 7 días de microfermentación (Figura 27). López (2018), reportó un pH que alcanzó un valor entre 6.4 – 6.6 en el día 1 de la microfermentación, que luego descendió hasta un valor entre 5.6 – 5.8 a los 7 días de microfermentación. Esta disminución en el pH es causada por la difusión de ácidos orgánicos en los cotiledones producidos por bacterias ácido lácticas y bacterias ácido acéticas durante el proceso de fermentación (Rodríguez-Campos et al., 2011).

Las mezclas de microorganismos presentaron un pH entre 6.19 y 6.34 en el día 1 de la microfermentación. Estos pH fueron menores en comparación al control, lo cual probablemente se debe a la actividad metabólica de las levaduras *Wickerhamomyces anomalus* y *Debaryomyces hansenii*. Diversos estudios han reportado un consumo más rápido de carbohidratos (glucosa y fructosa) en la fermentación inoculada que en el control (Batista et al., 2015; Ramos et al., 2014; Visintin et al., 2017). En el día 3 de la microfermentación, la mezcla (2:1:1) fue el tratamiento que evidenció una disminución significativa en el pH, con un valor de

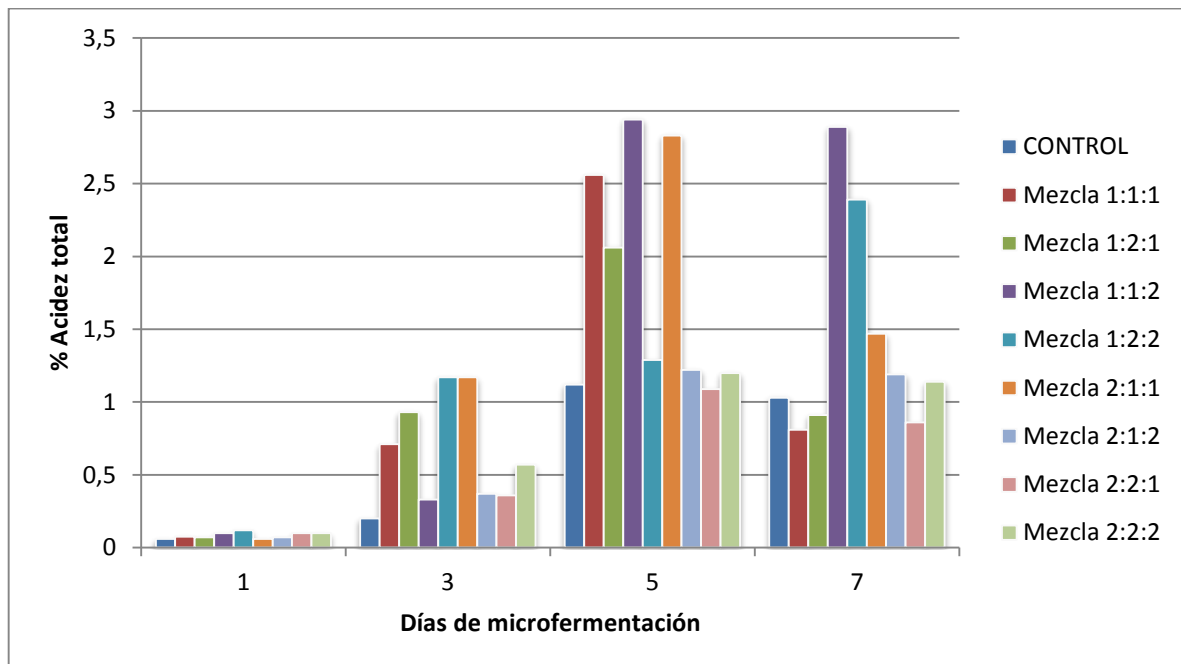
4.71. Resultados similares fueron encontrados por Crafacck et al. (2013), utilizando dos cultivos iniciadores mixtos compuestos de *Lb. fermentun* y *A. pasteurianus* en combinación con *Pichia kluyveri* o *Kluyveromyces marxianus*. En el día 5 de la microfermentación, la mezcla (1:1:2) presentó el menor pH entre todos los tratamientos, con un valor de 4.60. Esto puede deberse a una la alta concentración de ácido acético producto de la alta proporción de bacterias ácido acéticas en la mezcla. En el último día de la microfermentación, el pH de las mezclas (2:1:1) y (2:1:2) estuvieron dentro del rango óptimo de pH de los granos bien fermentados, con valores de 5.05 y 5.07, respectivamente. Crafacck et al. (2014), registraron un pH final de 5.0 en el cotiledón, usando un cultivo compuesto de *Pichia kluyveri*, *Lactobacillus fermentum* y *Acetobacter pasteurianus*.

El pH final de las mezclas (2:2:2), (2:2:1) y (1:1:1) fluctuó entre 5.52 y 5.60. Los granos con estos valores de pH son considerados altos por Jinap & Dimick. (1990), que tienen un sabor amargo y bajo sabor a chocolate (Jinap et al., 1995). Por último, las mezclas (1:1:2) y (1:2:2) finalizaron con pH de 4.54 y 4.63, respectivamente. Un pH menor a 5.0 indica presencia de ácidos no volátiles indeseables que dan al chocolate aromas desagradables, lo cual sucede en fermentaciones incompletas (Armijos, 2002).

8.5.2. Cambios en la acidez total del grano de cacao durante la microfermentación por el efecto de diferentes mezclas de microorganismos

Los ácidos se generan en los granos de cacao durante la fermentación como resultado de las acciones de microorganismos que descomponen los azúcares en la pulpa que resultan en la producción de alcoholes y ácidos orgánicos, predominantemente ácido acético (Afoakwa et al., 2011; Schwan & Wheals, 2004). La presencia de ácidos durante la fermentación es necesaria para matar el embrión de la semilla, evitar la germinación e inducir las reacciones bioquímicas que producen los precursores del sabor a chocolate (Jinap & Dimick, 1990). Sin embargo, la alta producción de ácido es perjudicial porque una difusión excesiva de los ácidos en los granos, resulta en la producción de granos ácidos (Afoakwa et al., 2013).

Figura 28. Cambios en el porcentaje de acidez del grano de cacao durante la microfermentación por el efecto de diferentes mezclas de microorganismos

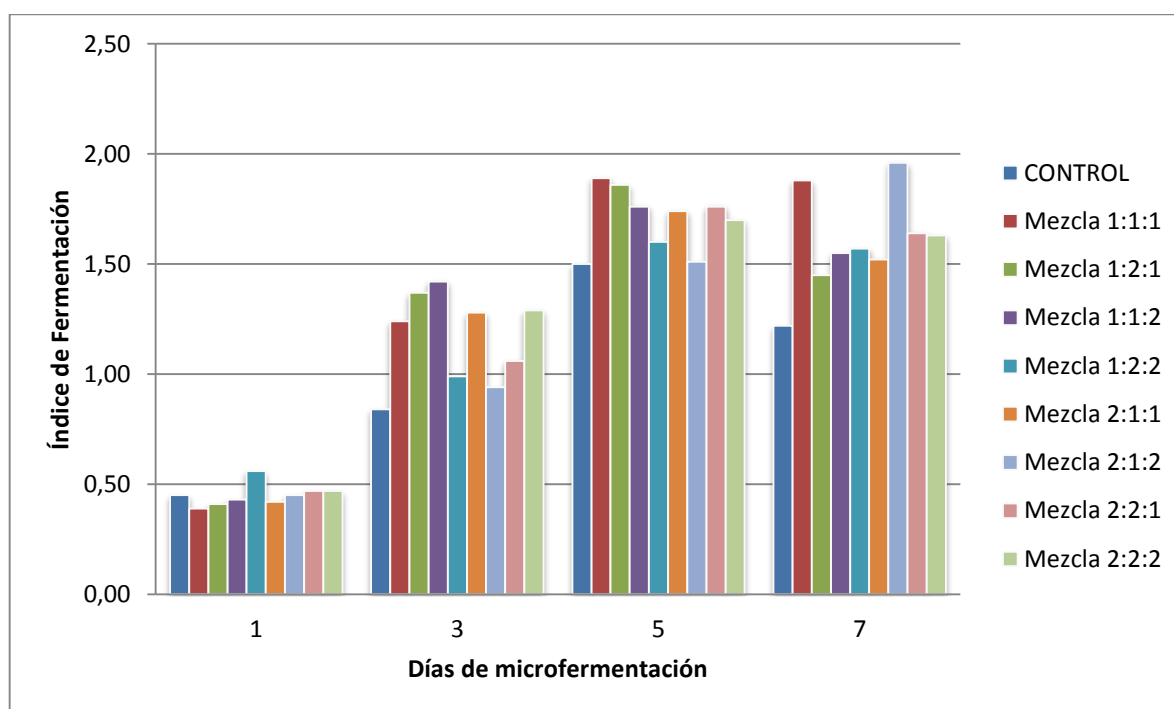


Se puede observar en la Figura 28, que en el día 1 de la microfermentación hay un bajo porcentaje de acidez de la semilla. En el día 3 de la microfermentación, el porcentaje de acidez de la semilla fue más alto en las microfermentaciones inoculadas (0.33% - 1.17%) que en el control (0.20%). Lo que sugiere que las mezclas de microorganismos aumentan la producción de ácidos orgánicos, puesto que los ácidos son los responsables de la alta acidez en los granos de cacao (Jinap & Dimick, 1990). En el día 5 de la microfermentación, se observa un aumento significativo en el porcentaje de acidez en todos los tratamientos. Esto sucede por la aireación de la masa que se realizó después del día 3 de la microfermentación, que permite que las bacterias ácido acéticas oxiden el etanol a ácido acético, lo que provoca un aumento de la acidez titulable en granos de cacao (Nielsen et al., 2007). En el último día de la microfermentación (7 días), la mezcla (1:1:2) alcanzó el mayor porcentaje de acidez, con un valor de 2.89%. Rodríguez-Campos et al., (2011), indicaron que altos valores del parámetro de acidez tienen relación con bajo valores de pH. Lo cual se confirma en nuestro estudio, ya que la mezcla (1:1:2) fue la que registró el pH más bajo en el día 7 de la microfermentación.

8.5.3. Cambios en el índice de fermentación del grano de cacao durante la microfermentación por el efecto de diferentes mezclas de microorganismos

En los granos de cacao, las antocianinas se hidrolizan enzimáticamente a antocianidinas, que se polimerizan con catequinas simples para formar procianidinas de alto peso molecular o taninos complejos durante la fermentación (Kyi et al., 2005). El contenido de antocianinas ha sido considerado como un buen índice para determinar el grado de fermentación del grano de cacao, junto con la formación de color marrón (Pettipher, 1986). Granos de cacao fermentados con valores de índice de fermentación (IF) <1 indican baja fermentación, mientras que los granos fermentados con valores de IF ≥ 1 se consideran bien fermentados (Kongor et al., 2013).

Figura 29. Cambios en el índice de fermentación del grano de cacao por el efecto de diferentes mezclas de microorganismos



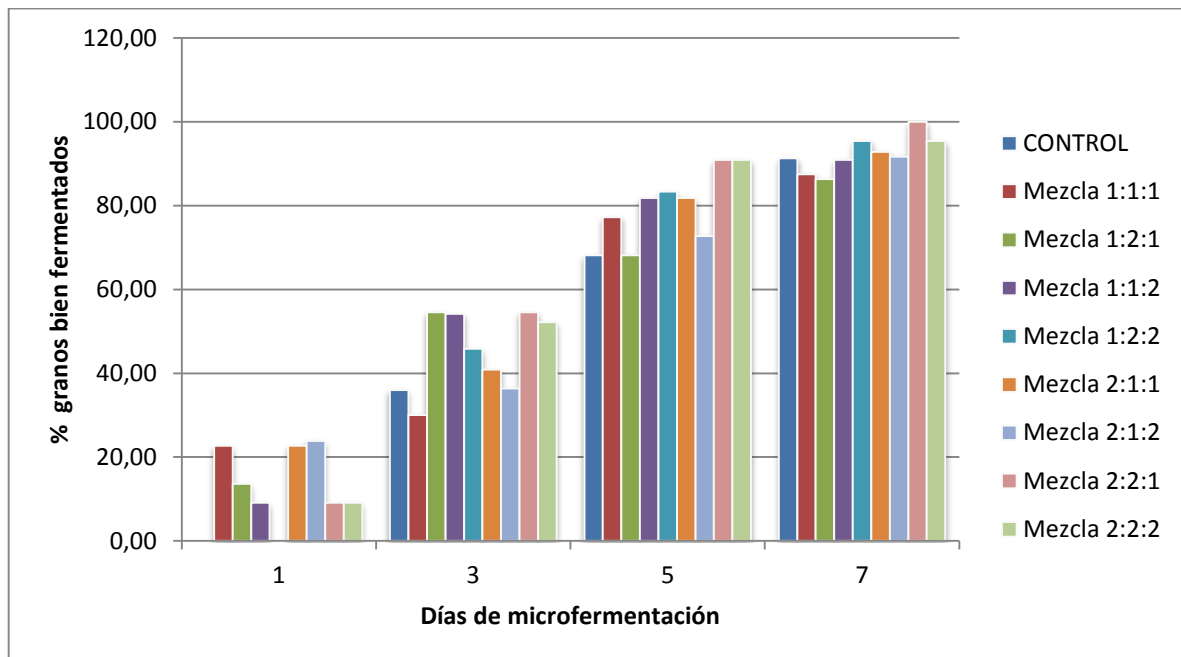
El análisis de los resultados del índice de fermentación indica que a las 72 h de fermentación en seis mezclas (2:2:1, 1:1:1, 2:1:1, 2:2:2, 1:2:1, 1:1:2) presentaban granos bien fermentados (1.06 – 1.42) comparado con el control (0.84) (Figura 29).

López (2018), menciona que se debe tener en cuenta otros factores como el pH de la semilla, para afirmarlo. Un ejemplo que corrobora lo anterior, es la mezcla (1:1:2) que alcanzo un índice de fermentación de 1.42 que corresponde a granos bien fermentados. Sin embargo, dicha mezcla presentó un pH de 6.04 que no es propio de granos bien fermentados. Después de 120 h de microfermentación, todos los tratamientos (Mezclas y control) alcanzaron un valor de índice de fermentación > a 1. Siendo mayor en las microfermentaciones inoculadas que en el control. En el último día de microfermentación (168 h), el control finalizó con un valor de índice de fermentación (IH) de 1.22. Mientras que en las mezclas de microorganismos el IH varió de 1.45 a 1.96. Siendo este último valor el de la mezcla (2:1:2), cuyo pH de 5.07 corresponde al de granos bien fermentados de acuerdo a Afoakwa et al., (2008).

8.5.4. Cambios en la prueba de corte durante la microfermentación por el efecto de diferentes mezclas de microorganismos

La prueba de corte es un método ampliamente utilizado para determinar el grado de fermentación de los granos de cacao (Kongor et al., 2013). Esta prueba subjetiva se basa en la observación visual de los cambios de color de los granos (Bariah, 2014). El grado de fermentación se determina agrupando los granos de color marrón, marrón/morado y morado. En la que los granos marrones son típicos de una buena fermentación y los granos morados son característicos de un grano mal fermentado (Hernández-Hernández et al., 2016).

Figura 30. Cambios en la prueba de corte durante la microfermentación por el efecto de diferentes mezclas de microorganismos



El resultado de la prueba de corte (Figura 30) mostró que para el día 5 de la microfermentación, los granos de cacao provenientes de las mezclas (1:1:1), (1:1:2), (1:2:2), (2:1:1), (2:2:1) y (2:2:2) alcanzaron la categoría "premio" de acuerdo a la Norma Técnica Colombiana NTC 1252 (2003). La cual establece un valor máximo de 25 granos insuficientemente fermentados por 100 granos muestreados para un cacao premio. Solo hasta el día 7 de la microfermentación, los granos de cacao del control lograron la categoría premio. Lo anterior coincide con lo reportado por López (2018).

8.5.5. Análisis sensorial de la microfermentación

La evaluación sensorial es una técnica que permite determinar la calidad de un producto por sus propiedades de aroma, sabor y textura (Martínez Guerrero, 2016). El sabor es un criterio clave de calidad para los fabricantes de productos de cacao (CAOBISCO et al., 2015). Para el análisis sensorial de licores de cacao, se contó con la participación de cinco panelistas entrenados de Agrosavia sede Nataima, que evaluaron utilizando una escala de 0 a 10, sabores básicos: cacao, ácido,

astringente y amargo. Así mismo, sabores específicos como floral, frutal, nuez, verde y panela malta (Figura 31)

El control se destacó por su sabor a nuez y baja acidez, intensidad media en el sabor a cacao. Se percibieron bajos tonos de frutal, floral y panela malta.

La mezcla (1:1:1) presentó intensidad media en los atributos amargo y cacao, con baja intensidad en frutal y nuez.

La mezcla (1:2:1) presentó sabor a cacao, notas frutales, con baja intensidad en nuez y panela malta.

En la mezcla (1:1:2) se destacó la acidez, astringencia, niveles medios en los atributos a cacao y amargo, con bajo nivel en panela malta

En la mezcla (1:2:2) resaltó el sabor a cacao; se percibieron intensidades medias en la acidez y sabor a frutal, bajo nivel en nuez y panela malta.

La mezcla (2:1:1) presentó sabor a cacao, niveles medios en la acidez y amargo, con baja intensidad en frutal y nuez.

La mezcla (2:1:2) se destacó por su sabor a panela malta y baja astringencia; se percibieron notas frutales, sabor a cacao, bajo nivel en la acidez y amargo, además matices en nuez.

En la mezcla (2:2:1) presentó sabor a cacao, baja intensidad en notas frutales y panela malta.

La mezcla (2:2:2) presentó niveles iguales en la acidez y la astringencia, intensidad media en el sabor a cacao, se percibieron tonos frutales, bajo nivel en nuez y panela malta.

El perfil sensorial del control es consistente con el obtenido por López (2018), al encontrar sabor a cacao, frutal, nuez y panela malta en muestra de cacao provenientes del genotipo ICS 95, el cual fue utilizado en nuestro estudio. Martínez (2016) informó notas de nuez y frutal en ICS 95. Este mismo autor encontró que las características sensoriales del cacao varían de acuerdo al origen.

El sabor a cacao presentó mayor valor en las mezclas (1:2:2) y (2:1:2), con puntuación de 4.00 y 3.89, respectivamente. En contraste, el menor valor se obtuvo en el control, con una calificación de 3.11 (Anexo 45). La acidez más alta se presentó en las mezclas (1:1:2) y (1:2:2), con puntajes de 4.00 y 3.44, respectivamente. Dichas mezclas fueron las que registraron valores más bajos de pH y altos valores de acidez total. Holm et al., (1993), encontraron una relación entre la concentración de ácido acético y el pH, indicaron que este ácido es el responsable del sabor ácido en cacao.

En cuanto a la astringencia, se encontró el mayor valor en la mezcla (1:1:2) y el menor valor en la mezcla (2:1:2). La sensación de astringencia es impartida por los polifenoles (Afoakwa et al., 2008; Lima et al., 2011). Se considera importante realizar otros estudios, que ayuden a dilucidar el efecto de las mezclas de microorganismos sobre el contenido de polifenoles en los granos de cacao.

En el sabor amargo, el valor más alto lo obtuvo la mezcla (2:1:1), con una puntuación de 3.22; mientras que el valor más bajo se registró en la mezcla (1:2:2), con una calificación de 1.67. El gusto a amargo está determinado por los compuestos de metilxantinas que están presentes en los granos de cacao, principalmente teobromina y cafeína (Vázquez et al., 2016).

El sabor frutal presentó mayores valores en los licores de cacao de las mezclas de microorganismos que el control; En contraste, las notas florales se percibieron mucho más en el control que en las mezclas. Los ésteres se correlacionan con notas frutales y los alcoholes con notas florales (Moreira et al., 2017). Entretanto, las notas de nuez y panela malta fueron más perceptibles en el control y en la mezcla (2:1:2), respectivamente. Las pirazinas son sustancias químicas volátiles que se generan durante el tostado, responsables del sabor a nuez (González et al., 2012). El sabor verde estuvo ausente tanto en el control como en las mezclas de microorganismos. La presencia del sabor verde, indica que hay granos violetas que no han concluido su proceso de fermentación (Quezada et al., 2017). Se puede concluir que los granos de cacao de todos los tratamientos estaban bien fermentados en el día 7 de la microfermentación.

De acuerdo con los resultados del análisis sensorial, se puede inferir que los licores de cacao provenientes de las mezclas de microorganismos mostraron mejores perfiles sensoriales en comparación con el control. Puesto que acentuaron el sabor a cacao, disminuyeron la astringencia y amargor, aumentaron las notas frutales y sabor a panela malta en el cacao. Lo que demuestra que el uso de cultivos iniciadores contribuye a la formación de sabores específicos, que son característicos en los cacaos finos y de aroma. Los cuales son demandados por los fabricantes de chocolates especiales, para dar al producto final un sabor distintivo

Figura 31. Perfiles sensoriales del cacao proveniente de diferentes mezclas de microorganismos

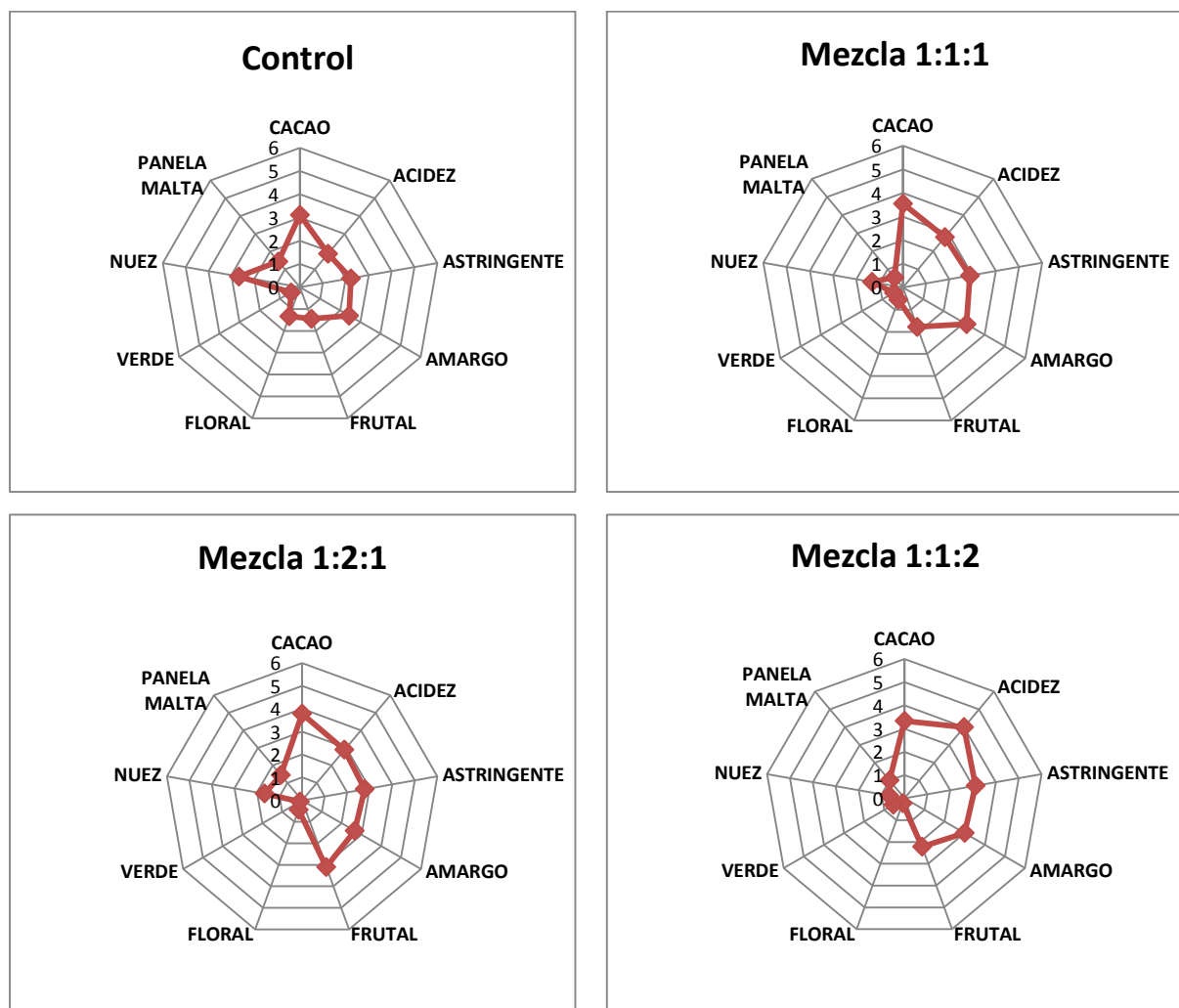
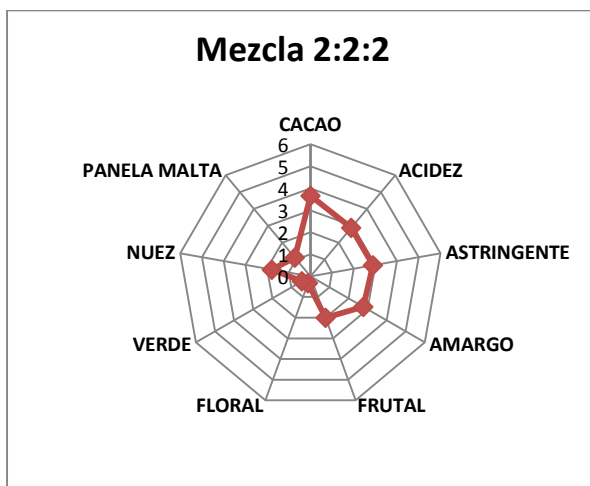
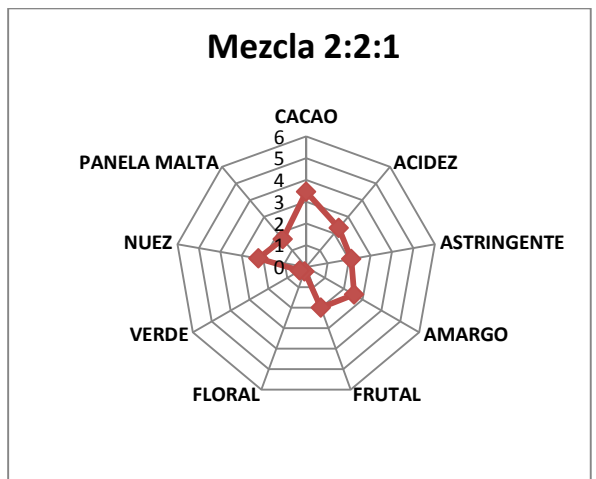
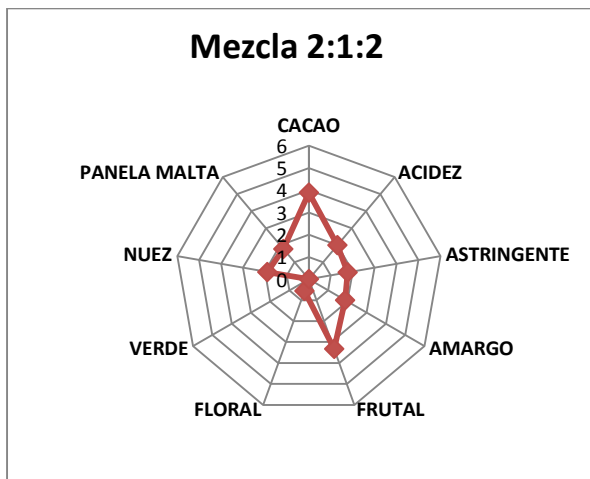
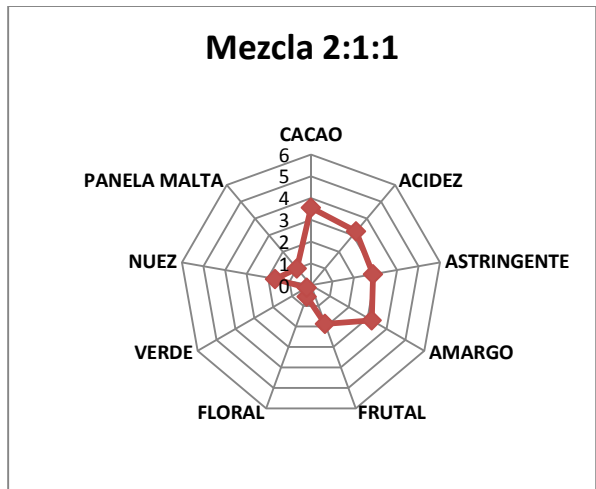
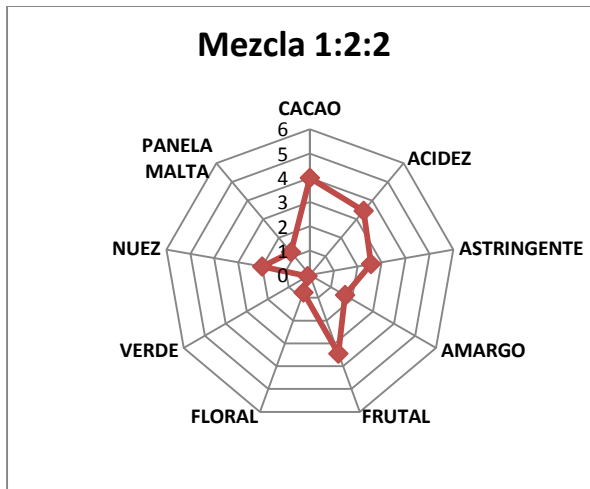


Figura 31. (Continuación).



8.6. EVALUACIÓN DE UNA MEZCLA DE MICROORGANISMOS A ESCALA PILOTO SOBRE LA CALIDAD DEL GRANO DE CACAO

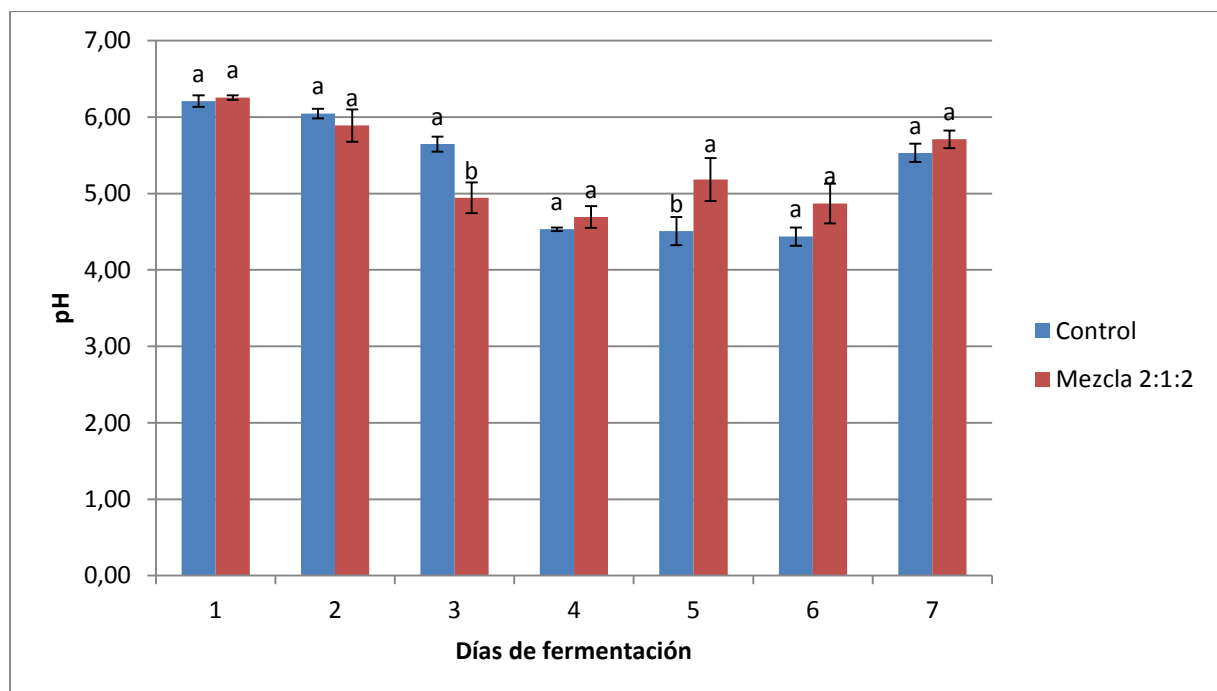
La mezcla (2:1:2) fue seleccionada para evaluar su efecto sobre la calidad del grano a nivel de campo, ya que presentó menores valoraciones de amargo y astringencia, sobresaliendo los sabores especiales de cacao, frutal, nuez, y panela malta.

8.6.1. Cambios en el pH del grano de cacao durante la macrofermentación por el efecto de mezcla de microorganismos

En el día 1 de la fermentación, el pH del control fue menor que la mezcla (2:1:2). Al finalizar la fase anaeróbica (72 h), el pH fue menor en el tratamiento inoculado que en el control (Figura 32). Esto es consistente con lo reportado en diversos estudios (Crafack et al., 2013; Ho, Fleet, & Zhao, 2018), donde informan una mayor acidificación de los granos de cacao en las fermentaciones inoculadas que en la fermentaciones espontánea a las 72 h. En el día 4 de la fermentación, el pH alcanzó el mínimo valor (4.69 ± 0.14) en la mezcla (2:1:2). Sin embargo, este valor fue mayor comparado con el pH del control (4.53 ± 0.02). Esto es diferente a lo obtenido por Crafack et al. (2013), quienes informaron mayor acidificación en el cotiledón de los granos de fermentaciones inoculadas que en la fermentación espontánea. Al encontrar un pH de 4.69 en el control y valores de pH de 4.59 y 4.65 utilizando *Pichia Kluyveri* CH/*Lactobacillus fermentum* L18/*Acetobacter pasteurianus* A149 y *Kluyveromyces marxianus* 16-6/*Lactobacillus fermentum* L18/*Acetobacter pasteurianus* 149 en la fermentación de granos de cacao, respectivamente. Lo anterior sugiere que en nuestro estudio hubo mayor concentración de ácido acético en el cotiledón de los granos de la fermentación natural que en la fermentación inoculada con la mezcla (2:1:2), posiblemente debido a una alta actividad metabólica de las bacterias ácido acéticas en el control. Después de 5 días de fermentación, se observó un cambio en el comportamiento del pH, en donde se empezó a dar un ascenso en el pH del grano de cacao en el tratamiento inoculado. Este aumento en el pH también fue encontrado por Crafack et al (2013). Según Saltini et al. (2013), estos cambios son extremadamente importantes para el desarrollo del sabor. El pH del grano de cacao de la fermentación inoculada fue de 5.18 ± 0.28 . Dicho valor está dentro del rango óptimo de pH (4.75-5.19) propuesto por Afoakwa, (2010) y en el rango normal de pH (5.0 - 5.5) que establece Fedecacao

(2005), los cuales indican que los granos están bien fermentados. Asimismo, los valores de pH dentro de estos rangos, permiten que haya una óptima actividad de las proteasas endógenas, que son esenciales para la degradación de las proteínas de almacenamientos del grano y la producción de precursores de sabor a chocolate (Ho et al., 2014). En la fermentación natural, la acidificación de los granos continuo hasta el día 6 de la fermentación, donde alcanzó su punto más bajo, con un pH de 4.44 ± 0.12 . La fuerte acidificación del cotiledón (pH 4.0 - 4.5) causa una proteólisis inespecífica de todas las proteínas presentes en el cotiledón del cacao, que producen un bajo potencial de sabor a chocolate (Crafack et al., 2014). Solo hasta el séptimo día de la fermentación, el control logró el pH (5.53 ± 0.12) que indica el fin de la fermentación. Los resultados obtenidos sugieren que la mezcla de microorganismos puede reducir el tiempo del proceso de fermentación del grano de cacao aproximadamente entre 24 y 48 horas.

Figura 32. Cambios en el pH del grano de cacao durante la fermentación por el efecto de mezcla de microorganismos



Las barras indican la desviación estándar (n=3). Medias con una letra común no son significativamente diferentes (Prueba Tukey, $P > 0.05$).

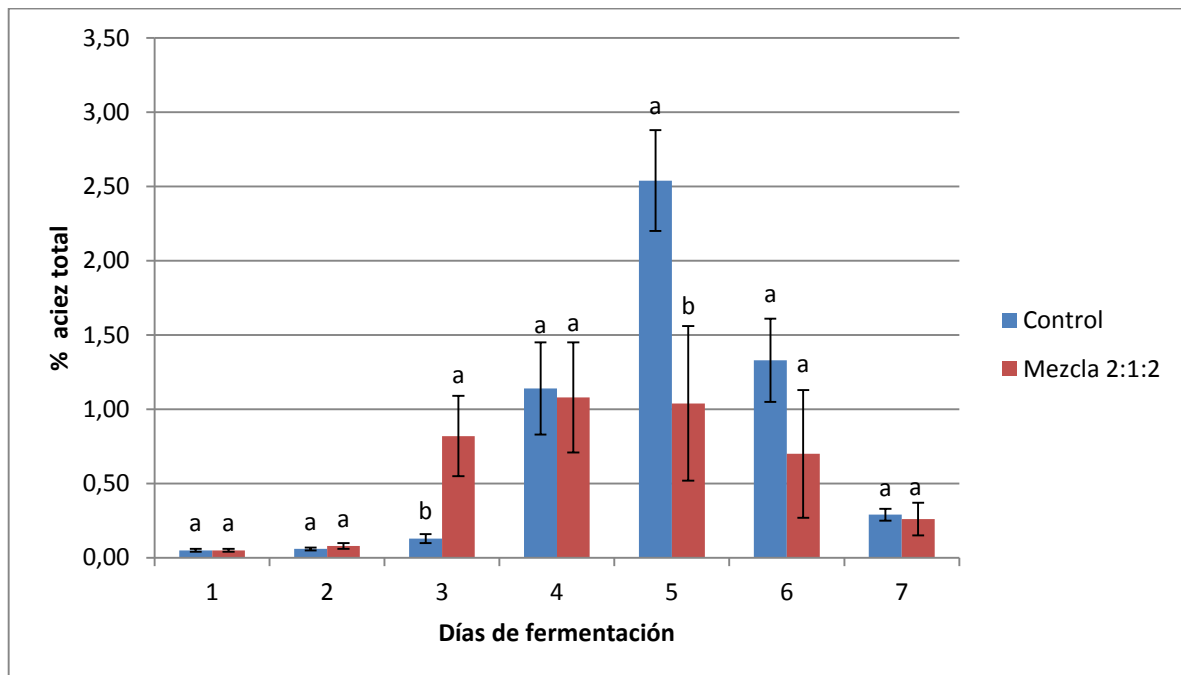
El análisis de varianza mostró diferencias significativas ($p < 0.05$) en el pH en los días 3 y 5 de la fermentación (Anexos 56 y 64). Los valores de pH estuvieron entre 4.94 y 5.65 (mezcla-control) a las 72 h y entre 4.51 y 5.18 (control-mezcla); a las 120 h. Estos resultados difieren de los valores obtenidos por Llerena & Uriña (2017), quienes registraron un pH de 6.15 en la fermentación natural y un pH de 6.49 en la fermentación con cultivos microbianos; a las 72 h de fermentación, utilizando el mismo genotipo (CCN 51) y método de fermentación (Cajón de madera). Estas diferencias podrían haber resultado de la microbiota, épocas de cosechas y condiciones climáticas diferentes de cada país.

8.6.2. Cambios en la acidez total del grano de cacao durante la macrofermentación por el efecto de mezcla de microorganismos

En los primeros 2 días de fermentación, no se presentaron diferencias significativas, se observó un bajo porcentaje de acidez total en los dos tratamientos (Figura 33). En el día 3 de la fermentación, se presentaron diferencias significativas entre el control y la mezcla (2:1:2), siendo más alto el porcentaje de acidez en el tratamiento inoculado. Este comportamiento es similar a lo registrado por López (2018), lo cual puede ser explicado por una mayor producción de ácidos orgánicos estimulada por el inóculo mixto. Esto es confirmado por Ho et al (2018), quienes reportaron concentraciones de ácido acético en el grano de (0.8 – 1.1 mg/g) y (0.8 – 1.9 mg/g) en la fermentación natural y fermentación inoculada con Levaduras+BAL+BAA, respectivamente. El ácido acético es considerado un metabolito clave en la fermentación de cacao, porque se asocia con la muerte del embrión de la semilla, la alteración de la estructura celular del grano, el final del proceso de fermentación (Gutiérrez, 2017; Nielsen et al., 2007) y el inicio de las reacciones bioquímicas en el interior del grano de cacao, formando moléculas precursoras para el desarrollo completo del sabor y el color característico de los granos fermentados (Arana-Sánchez et al., 2015). En el día 4 de la fermentación, no se evidenciaron diferencias significativas en los tratamientos (Anexo 88). Este hecho puede deberse a que existían pocas diferencias en las concentraciones de ácido láctico y ácido acético entre los tratamientos. En el día 5 de la fermentación, se evidenciaron diferencias significativas (Anexo 92), en donde se muestra mayor nivel del porcentaje de acidez total en el control ($2.54 \pm 0.34\%$) que en el tratamiento

inoculado ($1.04 \pm 0.52\%$). Tales resultados difieren de los valores reportados por López (2018). La mayor producción de ácido en la fermentación no inoculada no concuerda con los hallazgos de investigaciones anteriores (Batista et al., 2015; Moreira et al., 2017), en donde reportan un incremento en la concentración de ácido acético con la adición de cultivos iniciadores. Sin embargo, Ramos et al (2014) informaron concentraciones de ácido acético más altas en los granos de híbridos PH16 y PS1319, fermentados espontáneamente que en las fermentaciones inoculadas con *Saccharomyces cerevisiae* UFLA CA11. Según este autor, debido a la evaporación parcial de etanol que incidió en la baja concentración de ácido acético al final del proceso de fermentación. Arango (2017) también encontró un porcentaje de ácido acético más alto en el control que en el tratamiento inoculado con levaduras. Dicho autor indicó que la adición de este grupo de microorganismos podría evitar el exceso de acidez del cacao CCN 51. En el día 6 de la fermentación, se observó una disminución en el porcentaje de acidez en ambos tratamientos, esto sugiere una disminución en la oxidación del etanol a ácido acético por bacterias ácido acéticas (BAA). Esta tendencia se prolongó hasta el séptimo día de la fermentación. Lo cual coincide con un aumento en el pH, posiblemente es debido a la evaporación de ácidos volátiles como el ácido acético (Afoakwa et al., 2013).

Figura 33. Cambios en la acidez total del grano de cacao durante la macrofermentación por el efecto de mezcla de microorganismos



Las barras indican la desviación estándar (n=3). Medias con una letra común no son significativamente diferentes (Prueba Tukey, $P > 0.05$).

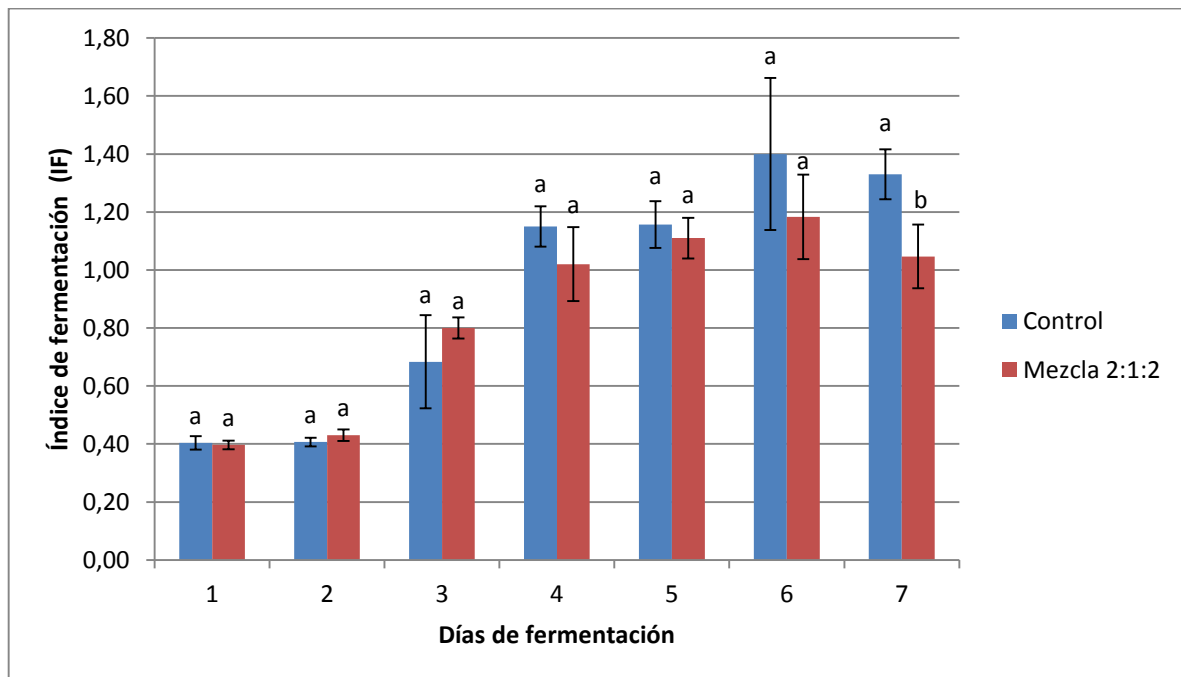
8.6.3. Cambios en el índice de fermentación del grano de cacao durante la macrofermentación por el efecto de mezcla de microorganismos

El índice de fermentación (IF) es un método que se basa en las variaciones de color en los cotiledones y se mide para determinar el grado de fermentación de los granos de cacao (Kongor et al., 2013; Misnawi, 2008). Además, el color del grano se utiliza para predecir el potencial de sabor de los granos de cacao (Misnawi et al., 2003) y su idoneidad para la fabricación de chocolates (Camu et al., 2008). La Figura 34 muestra un incremento en el índice de fermentación (IF) de los granos de cacao a medida que transcurre la fermentación. Lo cual ocurre, por un aumento en la intensidad del color marrón leído en la absorbancia a 460 nm y una disminución en la intensidad de color morado en la absorbancia a 530 nm (Misnawi, 2008). Los compuestos de polifenoles como las antocianinas son responsables del color morado de los granos de cacao sin fermentar (Kongor et al., 2013), que son hidrolizado a antocianidinas y azúcares (galactosa y arabinosa) por las glicosidasas (Camu et al., 2008), que se activan tan pronto la semilla muere y los sustratos

migran a los sitios activos, a niveles de pH entre 4.0 - 4.5 y 45 °C (Gutiérrez, 2017). Esto resulta en el blanqueo del color morado de los cotiledones y la liberación de azúcares reductores que pueden participar como precursores del sabor (Lima et al., 2011).

En los primeros dos días de fermentación no se presentaron diferencias significativas, el IF varió de 0.40 a 0.41 para el control y de 0.40 a 0.43 para la mezcla (2:1:2) (Figura 34). Al final de la fase anaeróbica (día 3), tampoco se registraron diferencias significativas entre los tratamientos (Anexo 112). Sin embargo, se observó un aumento en el IF; siendo mayor en la fermentación inoculada que en el control. En el día 4 de la fermentación, el índice de fermentación empezó a ser más alto en el control que en la mezcla (2:1:2), con valores de 1.15 y 1.02, respectivamente. Esta tendencia se extendió hasta el día 7 de la fermentación. En el último día de la fermentación, se observaron diferencias estadísticas y una disminución en el índice de fermentación; con valores de 1.33 para el control y 1.05 para la mezcla (2:1:2). Según estos resultados, se puede inferir que en la fermentación inoculada hubo menor degradación de los pigmentos de antocianinas frente al control. Por tanto, menos productos de condensación de antocianinas, como cianidina-3- β -D-galactósido y cianidina- α -L-arabinósido al final del proceso de fermentación (Bariah, 2014; Kongor et al., 2013; Nazaruddin et al., 2006). Hallazgo similar fue reportado por Pereira et al (2017), donde observaron un valor de índice de fermentación de 1.087 en la fermentación espontánea y valores de 1.068 y 1.083 para fermentaciones inoculadas con *Pichia kudriavzevii* LPB06 y *Pichia kudriavzevii* LPB07, respectivamente. Igualmente, López (2018) reportó mayor valor de índice de fermentación en el control frente a la mezcla (1:1:1) con las mismas especies de este trabajo, utilizando diferentes dosis (1%, 2%, 3%, 4% y 5%) en la masa de fermentación. Sandhya et al. (2016) encontraron menor contenido de antocianina en el inóculo microbiano (60%) en comparación con un inóculo de (10%) y fermentación natural. De acuerdo a lo anterior, se presume que aumentando la dosis de la mezcla (2:1:2) a 60%, se obtendrá menor concentración de antocianinas que el control. Por tanto, un índice de fermentación más alto en la fermentación inoculada que en la fermentación natural.

Figura 34. Cambios en el índice de fermentación del grano de cacao durante la macrofermentación por el efecto de mezcla de microorganismos



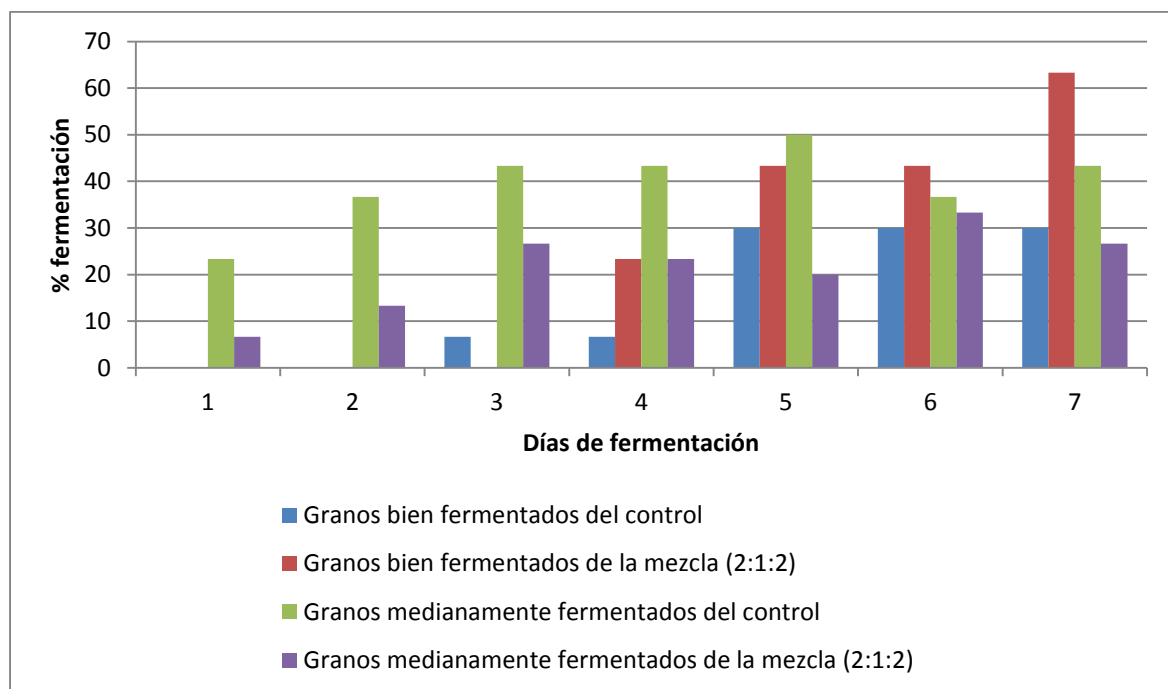
Las barras indican la desviación estándar (n=3). Medias con una letra común no son significativamente diferentes (Prueba Tukey, $P > 0.05$).

Los granos de cacao se consideran como no fermentados si el valor del índice de fermentación está por debajo de 1, 1.0 – 1.59 es completamente fermentado y más de 1.60 sobre fermentado (Bariah, 2014). De acuerdo con lo anterior, se puede decir que en el día 4, los granos de cacao estaban completamente fermentados en los dos tratamientos. No obstante, el pH del cotiledón (4.53 - 4.69) no corresponde a granos bien fermentados. En contraste, se ha reportado que el clon CCN 51 alcanza un valor de índice de fermentación mayor a 1, a las 120 h de fermentación (Horta, 2017). Estas diferencias pueden estar influenciadas por el estado de madurez del fruto (López, 2018) y el proceso de poscosecha del grano de cacao (Kongor et al., 2016). Por esta razón fue necesario analizar la prueba de corte y el análisis sensorial para establecer el mejor tratamiento y el tiempo de fermentación.

8.6.4. Cambios en la prueba de corte durante la fermentación del grano de cacao por el efecto de mezcla de microorganismos

La prueba de corte es un método simple que permite evaluar la calidad sanitaria, el grado de fermentación de los granos de cacao (Kongor et al., 2013) y ayuda a determinar el precio final del cacao (Hernández-Hernández et al., 2016). Los resultados de la prueba de corte se muestran en la Figura 35. La mezcla (2:1:2) produjo el mayor porcentaje de granos bien fermentados (63.33%) en el día 7 de fermentación. Además, estos granos presentaron un índice de fermentación de 1.05, que está dentro del rango de granos bien fermentados (Bariah, 2014) y un alto pH de 5.71 (Fedecacao, 2005; Jinap & Dimick, 1990). Para el caso del control, el mayor porcentaje de granos bien fermentados (30%) se presentó en el día 5 de fermentación. Este porcentaje fue igual en el día 6 y 7. El proceso de fermentación del control finalizó en el día 7 de fermentación. Porque es cuando se alcanzó el pH (5.53) e índice de fermentación (1.33) de granos bien fermentados.

Figura 35. Cambios en la prueba de corte de los granos de cacao durante la macrofermentación por el efecto de mezcla de microorganismos

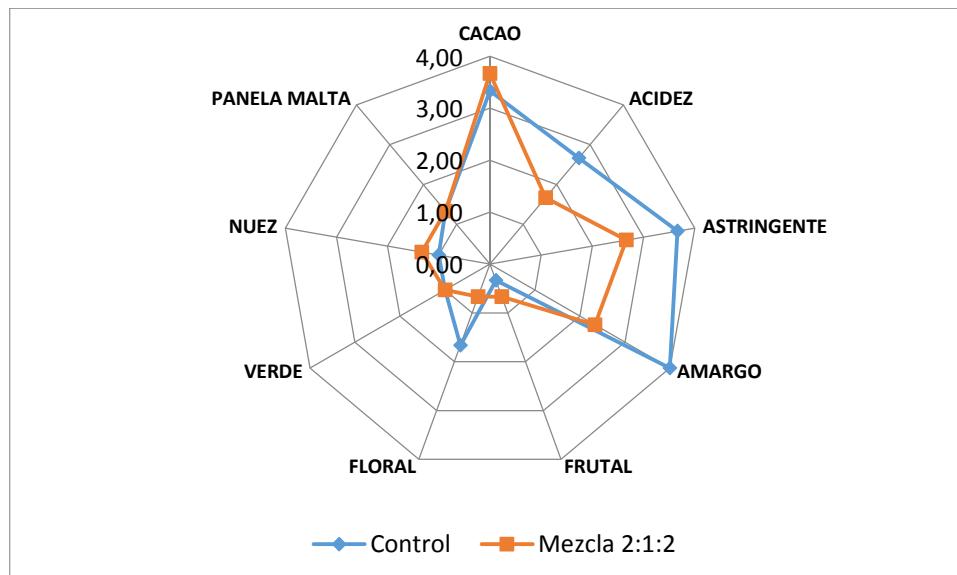


En resumen, los resultados del presente estudio demuestran que el uso de un cultivo iniciador (levaduras + bacterias ácido lácticas + bacterias ácido acéticas) aumenta el porcentaje de granos de bien fermentados. Sin embargo, no disminuye el tiempo de fermentación. Esto difiere de lo reportado por Sandhya et al. (2016), que utilizando un cultivo iniciador (*Saccharomyces cerevisiae* MTCC 173, *Lactobacillus plantarum* MTCC 5222 y *Acetobacter aceti* MTCC 3347) con un inóculo de 10 (w/v), redujeron el tiempo de fermentación a 3 días y alcanzaron 90% de fermentación. Basado en lo anterior, se cree que aumentando la dosis de la mezcla (2:1:2), se puede incrementar aún más el porcentaje de granos bien fermentados y reducir el tiempo de fermentación.

8.6.5. Análisis sensorial de la macrofermentación

El análisis sensorial de los licores de cacao de los tratamientos a los 6 días de fermentación indica que hubo diferencias entre los licores de cacao producido del control y el tratamiento inoculado.

Figura 36. Perfiles sensoriales de licores de cacao derivados de fermentación inoculada y sin inocular (Control)



El licor de cacao de la mezcla (2:1:2) presentó una calificación media en el sabor a cacao (3.67), baja acidez, bajo valor en sabor verde, notas de nuez y panela malta. Mientras que en el control, se obtuvo una menor calificación en sabor a cacao (3.33), se percibió más astringencia, acidez y amargor, bajo sabor verde, notas florales y sabor a panela malta (Figura 36). Previamente, se ha reportado que el clon CCN 51 presenta notas florales y de nuez y sensación de verde (Arango, 2017). Estas características organolépticas fueron encontradas en el perfil sensorial del control. Adicionalmente, se han informado altos niveles de amargo y astringencia, estos atributos sensoriales hacen que el CCN 51 sea poco atractivo para fabricantes de chocolates de sabor fino (Boza et al., 2014).

El nivel de acidez fue más alto en el control (2.67) que en el tratamiento inoculado (1.67). También, la astringencia y el amargor fueron más perceptibles en el control 3.67 y 4.00 respectivamente, comparados con el tratamiento inoculado que alcanzaron valores de 2.67 y 2.33 respectivamente. Esto puede deberse a que las concentraciones de polifenoles y metilxantinas fueron más bajas en el tratamiento inoculado. Ya que estos compuestos son responsables de la astringencia y el amargor de los granos (Camu et al., 2008). Respecto al sabor a cacao, este se percibió más en el tratamiento inoculado (3.67) que en el control (3.33). Porque en el primero se obtuvo mayor porcentaje de granos bien fermentados que en el segundo. Las muestras mejor fermentadas producen una expresión más fuerte del sabor a cacao (Quezada et al., 2017). Por último, el sabor a nuez y floral distinguió a la mezcla (2:1:2) y control, respectivamente. Las pirazinas se correlacionan con el sabor a nuez (González et al., 2012) y los alcoholes con notas florales (Moreira et al., 2017).

En conclusión, los resultados obtenidos en el presente estudio demostraron que la utilización de la mezcla (2:1:2) en la fermentación ayudó a mejorar el perfil sensorial del licor de cacao. Probablemente, aumentando la dosis de la mezcla en la fermentación se incrementará los sabores especiales. Lo cual permitirá diferenciar fácilmente granos de cacao provenientes de la fermentación inoculada y fermentación natural.

9. CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos indican que las levaduras *Debaryomyces hansenii*, *Meyerozyma guilliermondii* y *Wickerhamomyces anomalus* están bien adaptadas a condiciones de bajo pH y a altas concentraciones de azúcares fermentables.

De todas las bacterias evaluadas, *Lactobacillus plantarum* y *Gluconobacter japonicus* fueron las que mostraron mayor producción de ácido láctico y ácido acético, respectivamente.

La especie *Aureobasidium pullulans* mostró gran capacidad para sintetizar enzimas pectinolíticas. Esta levadura exhibió la máxima actividad de poligalacturonasa (PG) a pH de 6.5 durante 24 h de fermentación.

En cuanto a los resultados fisicoquímicos de la microfermentación, con las mezclas (2:1:1) y (2:1:2) se alcanzaron valores de pH final que están dentro del rango óptimo de granos bien fermentados. La mezcla (1:1:2) permitió obtener el mayor porcentaje de acidez total en los granos de cacao. Las mezclas de microorganismos ayudaron a conseguir valores de índice de fermentación mayores a 1 en el día 3 de fermentación. Respecto a los resultados de la prueba de corte, con las mezclas (1:1:1), (1:1:2), (1:2:2), (2:1:1), (2:2:1) y (2:2:2) se obtuvieron la categoría premio de la NTC 1252, en tan solo 5 días de fermentación. Sin embargo, solamente las mezclas (1:2:2) y (2:2:1) coincidieron con el pH normal que indica el fin del proceso de fermentación. Por tanto, con estas mezclas se redujeron el tiempo de fermentación a 5 días, en comparación con los 7 días del control.

De acuerdo con los resultados del análisis sensorial de la microfermentación, la mezcla (2:1:2) presentó el mejor perfil sensorial. Ya que fue el tratamiento que mostró el mayor sabor a panela malta, menor astringencia y amargo, baja acidez, buen sabor a cacao, notas frutales y sabor a nuez. En términos generales, los licores de cacao provenientes de las mezclas de microorganismos mostraron mejores perfiles sensoriales en comparación con el control. Puesto que acentuaron el sabor a cacao, disminuyeron la astringencia y amargor, aumentaron las notas frutales y sabor a panela malta en el cacao. Estos resultados comprueban que el uso

de cultivos iniciadores contribuye a la formación de sabores específicos, que son característicos en los cacaos finos y de aroma.

Los resultados obtenidos de la fermentación en campo, demuestran que la fermentación inoculada tuvo un proceso de acidificación y basificación del grano más rápido que la fermentación natural. El tratamiento inoculado alcanzó el pH indicado en el día 5 de la fermentación. Mientras que el tratamiento sin inocular se alcanzó hasta el día 7 de la fermentación. Respecto al porcentaje de fermentación, la mezcla (2:1:2) aumentó el porcentaje de granos bien fermentados comparado con el control. Sin embargo, el máximo porcentaje se logró en el último día de fermentación. El análisis sensorial mostró diferencias en el perfil sensorial entre el control y la mezcla (2:1:2) a los 6 días de fermentación. Se observó más intensidad en sabor a cacao, mayor calificación en el atributo de astringencia y amargo, sabor ácido y sensación verde en el licor de cacao del control. En cambio, el licor de cacao de la mezcla (2:1:2) presentó baja acidez, poca sensación de verde y más sabor a cacao y nuez.

10. RECOMENDACIONES

Se considera importante evaluar la actividad pectinolítica de las levaduras utilizando diferentes fuentes de carbono como glucosa, galactosa, ácido galacturónico y ácido poligalacturónico.

Se recomienda optimizar la producción de poligalacturonasa por *A. pullulans* evaluando factores como temperatura, composición del medio de cultivo (pectina, glucosa, extracto de levadura y KH_2PO_4) y la concentración del inóculo del microorganismo.

Realizar estudios que permitan caracterizar la dinámica microbiológica durante la fermentación inoculada y sin inocular, usando métodos independientes y dependientes de cultivos.

Se recomienda evaluar la mezcla de microorganismos en otros genotipos (ICS 39, TSH 565 y FEAR 5) y métodos de fermentación (escalera de madera, tambor rotatorio y en pila) que son utilizados por los cacaocultores en Colombia.

Determinar el efecto de la mezcla (2:1:2) sobre las concentraciones de azúcares (glucosa, fructosa), metabolitos (etanol, ácido láctico y ácido acético), polifenoles, metilxantinas y compuestos volátiles del grano de cacao.

Se recomienda evaluar la influencia de la mezcla de microorganismos y las técnicas de precondicionamientos como el almacenamiento de los granos de cacao y el despulpado sobre las variables fisicoquímicas y sensoriales del grano de cacao.

Teniendo en cuenta los resultados de la fermentación en campo, se sugiere incrementar las dosis de la mezcla de microorganismos en la masa de cacao, para comprobar si aumenta el porcentaje de fermentación y reduce el tiempo de fermentación.

11. BIBLIOGRAFÍA

- Afoakwa, E., Kongor, J., Takrama, J., & Budu, A. (2013). Changes in acidification, sugars and mineral composition of cocoa pulp during fermentation of pulp pre-conditioned cocoa (*Theobroma cacao*) beans. *International Food Research Journal*, 20(3), 1215–1222.
- Afoakwa, E. O. (2010). *Chocolate Science and Technology. Chocolate Science and Technology*. <http://doi.org/10.1002/9781444319880>
- Afoakwa, E. O., Kongor, J. E., Takrama, J., & Budu, A. S. (2013). Changes in nib acidification and biochemical composition during fermentation of pulp pre-conditioned cocoa (*theobroma cacao*) beans. *International Food Research Journal*, 20(4), 1843–1853.
- 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. <http://doi.org/10.1080/10408390701719272>
- Afoakwa, E. O., Quao, J., Budu, A. S., Takrama, J., & Saalia, F. K. (2011). Effect of pulp preconditioning on acidification, proteolysis, sugars and free fatty acids concentration during fermentation of cocoa (*Theobroma cacao*) beans. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 62(7), 755–764. <http://doi.org/10.3109/09637486.2011.581224>
- Afoakwa, E. O., Quao, J., Takrama, J., Budu, A. S., & Saalia, F. K. (2011). Chemical composition and physical quality characteristics of Ghanaian cocoa beans as affected by pulp pre-conditioning and fermentation. *Journal of Food Science and Technology*, 50(6), 1097–1105. <http://doi.org/10.1007/s13197-011-0446-5>
- Alean Valle, J. (2011). *MODELADO Y SIMULACIÓN DEL SECADO DE CACAO CON AIRE*. Universidad Nacional de Colombia - Sede Medellín.
- Alimardani-Theuil, P., Gainvors-Claisse, A., & Duchiron, F. (2011). Yeasts: An attractive source of pectinases - From gene expression to potential applications: A review. *Process Biochemistry*, 46(8), 1525–1537. <http://doi.org/10.1016/j.procbio.2011.05.010>
- Andújar, I., Recio, M. C., Giner, R. M., & Ríos, J. L. (2012). Cocoa polyphenols and their potential benefits for human health. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2012. <http://doi.org/10.1155/2012/906252>
- Arana-Sánchez, A., Segura-García, L. E., Kirchmayr, M., Orozco-Ávila, I., Lugo-Cervantes, E., & Gschaedler-Mathis, A. (2015). Identification of predominant yeasts associated with artisan Mexican cocoa fermentations using culture-dependent and culture-independent approaches. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 31(2), 359–369. <http://doi.org/10.1007/s11274-014-1788-8>
- Arango Angarita, J. (2017). *Evaluación del efecto de técnicas de fermentación en el sabor y aroma de cacao CCN-51 (Theobroma cacao L.) en la zona de Tumaco-*

Nariño. Universidad Nacional de Colombia, Bogota, Colombia.

- Arboleda Echavarría, R., & González Vásquez, A. (2010). *Análisis socioeconómico del sector cacaoero Colombiano. Escuela de Ingeniería de Antioquia*. Envigado. <http://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004>
- Ardhana, M. M., & Fleet, G. H. (2003). The microbial ecology of cocoa bean fermentations in Indonesia. *International Journal of Food Microbiology*, 86(1–2), 87–99. [http://doi.org/10.1016/S0168-1605\(03\)00081-3](http://doi.org/10.1016/S0168-1605(03)00081-3)
- Armijos, A. (2002). *Características de acidez como parámetro químico de calidad en muestras de cacao (Theobroma cacao L.) fino y ordinario de producción nacional durante la fermentación*. Pontificia Universidad Católica. Retrieved from Tesis de Licenciatura en Química
- Avallone, S., Brillouet, J. M., Guyot, B., Olguin, E., & Guiraud, J. P. (2002). Involvement of pectolytic micro-organisms in coffee fermentation. *International Journal of Food Science and Technology*, 37(2), 191–198. <http://doi.org/10.1046/j.1365-2621.2002.00556.x>
- Badrie, N., Bekele, F., Sikora, E., & Sikora, M. (2015). Cocoa Agronomy, Quality, Nutritional, and Health Aspects. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 55(5), 620–659. <http://doi.org/10.1080/10408398.2012.669428>
- Bariah, K. (2014). Impact of Fermentation Duration on the Quality of Malaysian Cocoa Beans Using Shallow Box, (July), 74–80.
- Barragan, A. A., & Rey Forero, L. C. (2004). *Establecimiento de núcleos productivos de Cacao (Theobroma Cacao) en torno a microcentrales de beneficio para mejorar la calidad del grano en la región del distrito agroindustrial del Magdalena Caldense*. Universidad Nacional de Colombia sede Manizales, Colombia.
- Batista, L. (2009). Guía Técnica El Cultivo de Cacao. *Santo Domingo, Republica Dominicana. Centro Para El Desarrollo Agropecuario Y Forestal CEDAF*, 2(1), 250. [http://doi.org/10.1016/S0365-6691\(10\)70034-4](http://doi.org/10.1016/S0365-6691(10)70034-4)
- Batista, N. N., Ramos, C. L., Dias, D. R., Pinheiro, A. C. M., & Schwan, R. F. (2016). The impact of yeast starter cultures on the microbial communities and volatile compounds in cocoa fermentation and the resulting sensory attributes of chocolate. *Journal of Food Science and Technology*, 53(2), 1101–1110. <http://doi.org/10.1007/s13197-015-2132-5>
- 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. <http://doi.org/10.1016/j.lwt.2015.03.051>
- Bennamoun, L., Hiligsmann, S., Dakhmouche, S., Ait-Kaki, A., Labbani, F.-Z., Nouadri, T., ... Thonart, P. (2016). Production and Properties of a Thermostable, pH—Stable Exo-Polygalacturonase Using *Aureobasidium*

- pullulans Isolated from Saharan Soil of Algeria Grown on Tomato Pomace. *Foods*, 5(4), 72. <http://doi.org/10.3390/foods5040072>
- Bernardo, M. P., Coelho, L. F., Sass, D. C., & Contiero, J. (2016). L-(+)-Lactic acid production by *Lactobacillus rhamnosus* B103 from dairy industry waste. *Brazilian Journal of Microbiology*, 47(3), 640–646. <http://doi.org/10.1016/j.bjm.2015.12.001>
- Biely, P., Heinrichová, K., & Kružíková, M. (1996). Induction and inducers of the pectolytic system in *Aureobasidium pullulans*. *Current Microbiology*, 33(1), 6–10. <http://doi.org/10.1007/s002849900065>
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72(1–2), 248–254. [http://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](http://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3)
- CacaoNet. (2012). *Global Strategy for the Conservation and Use of Cacao Genetic Resources, as the Foundation for a Sustainable Cocoa Economy*. Montpellier, France: Bioversity International. <http://doi.org/10.1098/rstb.2007.2170>
- Camu, N., De Winter, T., Addo, S., Takrama, J. S., Bernaert, H., & De Vuyst, L. (2008). Fermentation of cocoa beans: influence of microbial activities and polyphenol concentrations on the flavour of chocolate. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 88, 22888–2297. <http://doi.org/10.1002/jsfa>
- 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. <http://doi.org/10.1128/AEM.02189-06>
- CAOBISCO, ECA, & FCC. (2015). *Cacao en Grano : Requisitos de Calidad de la Industria del Chocolate y del Cacao*.
- Cardona Velásquez, L. M. (2016). *Influencia del proceso de fermentación sobre las características de calidad del grano de cacao (Theobroma cacao) Influencia del proceso de fermentación sobre las características de calidad del grano de cacao (Theobroma cacao)*. Universidad Nacional de Colombia.
- Cardona Velásquez, L. M., Rodríguez-Sandoval, E., & Cadena Chamorro, E. M. (2016). Diagnóstico de las prácticas de beneficio del cacao en el departamento de Arauca. *Revista Lasallista de Investigación*, 13, 94–104. <http://doi.org/10.19052/ed.3663>
- Castellanos, O. F., Torres, L. M., Fonseca, S. L., Montañez, V. M., & Sánchez, A. (2007). *Agenda Prospectiva de Investigación de la Cadena Productiva del Cacao Chocolate*. Bogotá: Giro Editores Ltda. Retrieved from <http://sioc.minagricultura.gov.co/index.php/opc-documentoscadena?ide=6>
- Cebeci Güler, N., Tosun, & Aydin, F. (2017). The identification of *Meyerozyma guilliermondii* from blood cultures and surveillance samples in a university

- hospital in Northeast Turkey: A ten-year survey. *Journal de Mycologie Medicale*, 27(4), 506–513. <http://doi.org/10.1016/j.mycmed.2017.07.007>
- Charoenchai, C., Fleet, G. H., Henschke, P. A., & Todd, B. E. N. . (1997). Screening of non- *Saccharomyces* wine yeasts for the presence of extracellular hydrolytic enzymes. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 3(1), 2–8. <http://doi.org/10.1111/j.1755-0238.1997.tb00109.x>
- Chemeli Senedese, A. L., Filho, R. M., Regina, M., & Maciel, W. (2015). L-Lactic Acid Production by *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 10863. *The ScientificWorld Journal*, 2015.
- Contreras Pedraza, C. A. (2017). Análisis de la cadena de valor del cacao en Colombia: generación de estrategias tecnológicas en operaciones de cosecha y poscosecha, organizativas, de capacidad instalada y de mercado, 221. Retrieved from <http://www.bdigital.unal.edu.co/59141/1/1032373448-2017.pdf>
- Crafack, M., Keul, H., Eskildsen, C. E., Petersen, M. A., Saerens, S., Blennow, A., ... Nielsen, D. S. (2014). Impact of starter cultures and fermentation techniques on the volatile aroma and sensory profile of chocolate. *Food Research International*, 63(November), 306–316. <http://doi.org/10.1016/j.foodres.2014.04.032>
- Crafack, M., Mikkelsen, M. B., Saerens, S., Knudsen, M., Blennow, A., Lowor, S., ... Nielsen, D. S. (2013). Influencing cocoa flavour using *Pichia kluyveri* and *Kluyveromyces marxianus* in a defined mixed starter culture for cocoa fermentation. *International Journal of Food Microbiology*, 167(1), 103–116. <http://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2013.06.024>
- Cubillos, G., Merizalde, G. J., & Correa, E. (2008). *Manual de Beneficio de cacao. Secretaría de Agricultura de Antioquia, Compañía Nacional de Chocolates S.A, Corporación para Investigaciones Biológicas, Grupo GIEM Universidad de Antioquia*. Medellín (Antioquia), Colombia.
- 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. <http://doi.org/10.1111/j.1567-1364.2009.00520.x>
- Dano, S. D., Manda, P., Dembélé, A., Abla, A. M. J. K., Bibaud, J. H., Gouet, J. Z., & Sika, C. B. Z. M. (2013). Influence of fermentation and drying materials on the contamination of cocoa beans by Ochratoxin A. *Toxins*, 5(12), 2310–2323. <http://doi.org/10.3390/toxins5122310>
- De La Cruz, J., Vargas, M. ., & Del Angel, O. . (2012). *CACAO: Operaciones Poscosecha*. Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO). Retrieved from <http://www.fao.org/3/a-au995s.pdf>
- de Melo Pereira, G. V., Magalhães, K. T., de Almeida, E. G., da Silva Coelho, I., & Schwan, R. F. (2013). Spontaneous cocoa bean fermentation carried out in a novel-design stainless steel tank: Influence on the dynamics of microbial populations and physical-chemical properties. *International Journal of Food*

- Microbiology*, 161(2), 121–133. <http://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2012.11.018>
- 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. <http://doi.org/10.1111/jam.13045>
- Deshpande, M. S., Rale, V. B., & Lynch, J. M. (1992). Aureobasidium pullulans in applied microbiology: A status report. *Enzyme and Microbial Technology*, 14(7), 514–527. [http://doi.org/10.1016/0141-0229\(92\)90122-5](http://doi.org/10.1016/0141-0229(92)90122-5)
- Di Mattia, C., Martuscelli, M., Sacchetti, G., Beheydt, B., Mastrocola, D., & Pittia, P. (2014). Effect of different conching processes on procyanidin content and antioxidant properties of chocolate. *Food Research International*, 63, 367–372. <http://doi.org/10.1016/j.foodres.2014.04.009>
- Doyle, M., & Buchanan, R. (2013). *Food Microbiology: Fundamentals and Frontiers* (4th ed). ASM Press.
- Fahrurrozi, M. (2015). *Microbiological and Biochemical Investigations of Cocoa Bean Fermentation. Dissertation Submitted to the Department of Chemistry Faculty of Mathematics, Informatics, and Natural Sciences. University of Hamburg for the degree of Doctor of Natural Sciences by from Lombok, West Nusa Tenggara, Indonesia.* Retrieved from <http://lipi.go.id/publikasi/microbiological-and-biochemical-investigations-of-cocoa-bean-fermentation/21567>
- FEDECACAO. (2005). *Caracterización físicoquímica y beneficio del grano de cacao (Theobroma cacao L.) en Colombia.* Retrieved from http://www.fedecacao.com.co/site/images/recourses/pub_doctecnicos/fedecacao-pub-doc_09B.pdf
- FEDECACAO. (2018). Historico de Producción Nacional 2008-2017.
- Fowler, M. S. (2009). *Industrial Chocolate Manufacture and Use: Fourth Edition.* (S. Beckett, Ed.) *Industrial Chocolate Manufacture and Use: Fourth Edition.* <http://doi.org/10.1002/9781444301588>
- Galiotou-Panayotou, M., Kalantzi, O., & Aggelis, G. (1998). Modelling of simultaneous production of polygalacturonase and exopolysaccharide by Aureobasidium pullulans ATHUM 2915. *Antonie van Leeuwenhoek, International Journal of General and Molecular Microbiology*, 73(2), 155–162. <http://doi.org/10.1023/A:1000657403593>
- Garcia, C. A., Arrázola, G. S., & Durango, A. M. (2010). Biotecnológica Biotechnological Production of Lactic Acid. *TEMAS AGRARIOS*, 15(2).
- Georgieva, R., Koleva, P., Nikolova, D., Yankov, D., & Danova, S. (2009). Growth parameters of probiotic strain lactobacillus plantarum, isolated from traditional white cheese. *Biotechnology and Biotechnological Equipment*, 23(December 2015), 861–865. <http://doi.org/10.1080/13102818.2009.10818558>
- Geralda Da Silva, E., De Fátima Borges, M., Medina, C., Hilsdorf Piccoli, R., & Freitas Schwan, R. (2005). Pectinolytic enzymes secreted by yeasts from

- tropical fruits. *FEMS Yeast Research*, 5(9), 859–865.
<http://doi.org/10.1016/j.femsyr.2005.02.006>
- González, Y., Pérez, E., & Palomino, C. (2012). Factores que inciden en la calidad sensorial del chocolate. *Actualización En Nutrición*, 13.
- Guehi, S. T., Dabonne, S., Ban-Koffi, L., Kedjebo, D. K., & Zahouli, G. I. B. (2010). Effect of turning beans and fermentation method on the acidity and physical quality of raw cocoa beans. *Advance Journal of Food Science and Technology*, 2(3), 163–171.
- Guehi, T. S., Zahouli, I. B., Ban-Koffi, L., Fae, M. A., & Nemlin, J. G. (2010). Performance of different drying methods and their effects on the chemical quality attributes of raw cocoa material. *International Journal of Food Science & Technology*, 45(8), 1564–1571. <http://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2010.02302.x>
- Gutiérrez, T. J. (2017). State-of-the-Art Chocolate Manufacture: A Review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 16(6), 1313–1344. <http://doi.org/10.1111/1541-4337.12301>
- Hatmi, R. U., Kobarsih, M., & Cahyaningrum, N. (2015). Fungi Level Analysis of Cocoa Beans Based on Fermentation Box Type and Duration. *Procedia Food Science*, 3, 371–382. <http://doi.org/10.1016/j.profoo.2015.01.041>
- Hernández-Hernández, C., López-Andrade, P. A., Ramírez-Guillermo, M. A., Guerra Ramírez, D., & Caballero Pérez, J. F. (2016). Evaluation of different fermentation processes for use by small cocoa growers in Mexico. *Food Science and Nutrition*, 4(5), 690–695. <http://doi.org/10.1002/fsn3.333>
- Ho, V. T. T., Fleet, G. H., & Zhao, J. (2018). Unravelling the contribution of lactic acid bacteria and acetic acid bacteria to cocoa fermentation using inoculated organisms. *International Journal of Food Microbiology*, 279(April), 43–56. <http://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2018.04.040>
- Ho, V. T. T., Zhao, J., & Fleet, G. (2014). Yeasts are essential for cocoa bean fermentation. *International Journal of Food Microbiology*, 174, 72–87. <http://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2013.12.014>
- Ho, V. T. T., Zhao, J., & Fleet, G. (2015). The effect of lactic acid bacteria on cocoa bean fermentation. *International Journal of Food Microbiology*, 205, 54–67. <http://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2015.03.031>
- Holm, C. S., Aston, J. W., & Douglas, K. (1993). The effects of the organic acids in cocoa on the flavour of chocolate. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 61(1), 65–71. <http://doi.org/10.1002/jsfa.2740610111>
- Horta, H. (2017). *EVALUACIÓN DEL TIPO DE FERMENTADOR EN LA CALIDAD FINAL DE UNA MEZCLA DE CACAO (Theobroma cacao L.)*. Universidad del Tolima. Retrieved from <http://www.albayan.ae>
- Icontec. (2003). Norma Técnica Colombiana 1252. Retrieved from <http://www.grancolombia.com.co/pdf/norma.pdf>

- J. Boza, E., Motamayor, J. C., Amores, F., Cedeño-Amador, S., Tondo, C., Livingstone, D., ... Gutierrez, O. (2014). Genetic Characterization of the cacao (*Theobroma cacao* L.) clone "CCN 51" and its impact and significance on global cacao improvement and production. *Journal of the American Society for Horticultural Science. American Society for Horticultural Science*, 139(March), 219.
- Jaimes Suárez, Y., & Aranzazu Hernández, F. (2010). *Manejo de las enfermedades del cacao (Theobroma cacao L.) en Colombia, con énfasis en monilia (Moniliophthora roreri)*. Corpoica. Colombia.
- Jia, J., & Wheals, A. (2000). Endopolygalacturonase genes and enzymes from *Saccharomyces cerevisiae* and *Kluyveromyces marxianus*. *Current Genetics*, 38(5), 264–270. <http://doi.org/10.1007/s002940000160>
- Jinap, S., & Dimick, P. S. (1990). Acidic Characteristics of Fermented and Dried Cocoa Beans from Different Countries of Origin OF FOOD SCIENCE-547. *Journal of Food Science*, 55(2), 547–550.
- Jinap, S., Dimick, P. S., & Hollender, R. (1995). Flavour evaluation of chocolate formulated from cocoa beans from different countries. *Food Control*, 6(2), 105–110.
- Jurado-Gámez, H., Ramírez, C., & Aguirre, D. (2013). Cinética de fermentación de *Lactobacillus plantarum* en un medio de cultivo enriquecido como potencial probiótico*. *Veterinaria Y Zootecnia*, 7(2), 37–53.
- 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. <http://doi.org/10.1016/j.foodres.2016.04.010>
- Kongor, J. E., Hinneh, M., de Walle, D. Van, Afoakwa, E. O., Boeckx, P., & Dewettinck, K. (2016). Factors influencing quality variation in cocoa (*Theobroma cacao*) bean flavour profile - A review. *Food Research International*, 82, 44–52. <http://doi.org/10.1016/j.foodres.2016.01.012>
- Kongor, J. E., Takrama, J. F., Budu, A. S., Mensah-brown, H., & Afoakwa, E. O. (2013). Effects of Fermentation and Drying on the Fermentation Index and Cut Test of Pulp Pre-conditioned Ghanaian Cocoa (. *Journal of Food Science and Engineering*, 3(October 2015), 625–634. <http://doi.org/10.7189/jogh.06.010505>
- Kostinek, M., Ban-Koffi, L., Ottah-Atikpo, M., Teniola, D., Schillinger, U., Holzappel, W. H., & Franz, C. M. A. P. (2008). Diversity of predominant lactic acid bacteria associated with cocoa fermentation in Nigeria. *Current Microbiology*, 56(4), 306–314. <http://doi.org/10.1007/s00284-008-9097-9>
- Kyi, T., Daud, W., Mohammad, A., Samsudin, M., & Kadhum, A. (2005). The kinetics of polyphenol degradation during the drying of Malaysian cocoa beans Tin. *International Journal of Food Science and Technology*, 40, 321–331.
- Lagunes Gálvez, S., Loiseau, G., Paredes, J. L., Barel, M., & Guiraud, J. P. (2007).

- Study on the microflora and biochemistry of cocoa fermentation in the Dominican Republic. *International Journal of Food Microbiology*, 114(1), 124–130. <http://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2006.10.041>
- Lefebvre, T., Janssens, M., Camu, N., & De Vuyst, L. (2010). Kinetic analysis of strains of lactic acid bacteria and acetic acid bacteria in cocoa pulp simulation media toward development of a starter culture for cocoa bean fermentation. *Applied and Environmental Microbiology*, 76(23), 7708–7716. <http://doi.org/10.1128/AEM.01206-10>
- Lefebvre, T., Papalexandratou, Z., Gobert, W., Camu, N., & De Vuyst, L. (2012). On-farm implementation of a starter culture for improved cocoa bean fermentation and its influence on the flavour of chocolates produced thereof. *Food Microbiology*, 30(2), 379–392. <http://doi.org/10.1016/j.fm.2011.12.021>
- Lima, L. J. R. (2012). *Microbial ecology of the cocoa chain*. Thesis Submitted in partial fulfillment of the requirements for the degree of doctor at Wageningen University.
- Lima, L. J. R., Almeida, M. H., Rob Nout, M. J., & Zwietering, M. H. (2011). Theobroma cacao L., “the food of the gods”: Quality determinants of commercial cocoa beans, with particular reference to the impact of fermentation. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 51(8), 731–761. <http://doi.org/10.1080/10408391003799913>
- Llerena Arboleda, K., & Uriña Gómez, Z. (2017). *Uso de Cultivos Iniciadores (Starter) en la Fermentación de Cacao Tipo Nacional Clon 103 y CCN51 en la Estación Pichilingue ubicada en Quevedo - Provincia de los Ríos*. Universidad de Guayaquil.
- López Hernández, M. del P. (2018). *Efecto del estado de madurez de materiales de cacao sobre la calidad final del grano en los valles interandinos secos*. Universidad Nacional de Colombia – Sede Bogotá.
- Luna, F., Crouzillat, D., Cirou, L., & Bucheli, P. (2002). Chemical composition and flavor of Ecuadorian cocoa liquor. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(12), 3527–3532. <http://doi.org/10.1021/jf0116597>
- MADR. (2018). *Indicadores e Instrumentos Enero 2018 Indicadores Generales*. Ministerio de Agricultura.
- Magalhães da Veiga Moreira, I., Gabriela da Cruz Pedrozo Miguel, M., Lacerda Ramos, C., Ferreira Duarte, W., Efraim, P., & Freitas Schwan, R. (2016). Influence of Cocoa Hybrids on Volatile Compounds of Fermented Beans, Microbial Diversity during Fermentation and Sensory Characteristics and Acceptance of Chocolates. *Journal of Food Quality*, 39(6), 839–849. <http://doi.org/10.1111/jfq.12238>
- Magi, E., Bono, L., & Di Carro, M. (2012). Characterization of cocoa liquors by GC-MS and LC-MS/MS: Focus on alkylpyrazines and flavanols. *Journal of Mass Spectrometry*, 47(9), 1191–1197. <http://doi.org/10.1002/jms.3034>

- Manachini, P. L., Parini, C., & Fortina, M. G. (1988). Pectic enzymes from *Aureobasidium pullulans* LV 10. *Enzyme and Microbial Technology*, 10(11), 682–685. [http://doi.org/10.1016/0141-0229\(88\)90060-9](http://doi.org/10.1016/0141-0229(88)90060-9)
- Martin, M. A., Goya, L., & Ramos, S. (2013). Potential for preventive effects of cocoa and cocoa polyphenols in cancer. *Food and Chemical Toxicology*, 56, 336–351. <http://doi.org/10.1016/j.fct.2013.02.020>
- Martínez Guerrero, N. C. (2016). *Evaluación de componentes físicos, químicos, organolépticos y del rendimiento de clones universales y regionales de cacao (Theobroma cacao L.) en las zonas productoras de Santander, Arauca y Huila*. Universidad Nacional de Colombia - Bogotá. Retrieved from <http://www.bdigital.unal.edu.co/52543/>
- Martos, M. A., Zubreski, E. R., Combina, M., Garro, O. A., & Hours, R. A. (2013). Isolation of a yeast strain able to produce a polygalacturonase with maceration activity of cassava roots. *Food Science and Technology (Campinas)*, 33(2), 332–338. <http://doi.org/10.1590/S0101-20612013005000047>
- Meersman, E., Steensels, J., Mathawan, M., Wittocx, P. J., Saels, V., Struyf, N., ... Verstrepen, K. J. (2013). Detailed analysis of the microbial population in Malaysian spontaneous cocoa pulp fermentations reveals a core and variable microbiota. *PLoS ONE*, 8(12). <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0081559>
- Menezes, A. G. T., Batista, N. N., Ramos, C. L., de Andrade e Silva, A. R., Efraim, P., Pinheiro, A. C. M., & Schwan, R. F. (2016). Investigation of chocolate produced from four different Brazilian varieties of cocoa (*Theobroma cacao* L.) inoculated with *Saccharomyces cerevisiae*. *Food Research International*, 81, 83–90. <http://doi.org/10.1016/j.foodres.2015.12.036>
- Merín, M. G., Martín, M. C., Rantsiou, K., Cocolin, L., & De Ambrosini, V. I. M. (2015). Characterization of pectinase activity for enology from yeasts occurring in Argentine bonarda grape. *Brazilian Journal of Microbiology*, 46(3), 815–823. <http://doi.org/10.1590/S1517-838246320140160>
- Merín, M. G., Mendoza, L. M., Farías, M. E., & Morata de Ambrosini, V. I. (2011). Isolation and selection of yeasts from wine grape ecosystem secreting cold-active pectinolytic activity. *International Journal of Food Microbiology*, 147(2), 144–148. <http://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2011.04.004>
- Merín, M. G., Mendoza, L. M., & Morata de Ambrosini, V. I. (2014). Pectinolytic yeasts from viticultural and enological environments: Novel finding of *Filobasidium capsuligenum* producing pectinases. *Journal of Basic Microbiology*, 54(8), 835–842. <http://doi.org/10.1002/jobm.201200534>
- Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural, & MADR. (2014). MinAgricultura reconocerá \$800 por kilo de cacao como apoyo a la comercialización del producto. Retrieved from [https://www.minagricultura.gov.co/noticias/Paginas/MinAgricultura-reconocerá-\\$800-por-kilo-de-cacao-como-apoyo-a-la-comercialización-del-producto.aspx](https://www.minagricultura.gov.co/noticias/Paginas/MinAgricultura-reconocerá-$800-por-kilo-de-cacao-como-apoyo-a-la-comercialización-del-producto.aspx)
- Misnawi, J. (2008). Physico-chemical changes during cocoa fermentation and key

enzymes involved. *Review Penelitian Kopi Dan Kakao*, 24(1), 54–71. Retrieved from <https://scholar.google.at/scholar?hl=de&q=Misnawi%2C+S.+%282008%29.+Phy+psico-chemical+changes+during+cocoa+fermentation+and+key+enzymes+involved.+Review+Penelitian+Kopi+dan+Kakao%2C+24%281%29%2C+54-71.&btnG=&lr=>

- Misnawi, Jinap, S., Jamilah, B., & Nazamid, S. (2003). Effects of incubation and polyphenol oxidase enrichment on colour, fermentation index, procyanidins and astringency of unfermented and partly fermented cocoa beans. *International Journal of Food Science and Technology*, 38(3), 285–295. <http://doi.org/10.1046/j.1365-2621.2003.00674.x>
- Molnárová, J., Vadkertiová, R., & Stratilová, E. (2014). Extracellular enzymatic activities and physiological profiles of yeasts colonizing fruit trees. *Journal of Basic Microbiology*, 54(SUPPL.1), 1–11. <http://doi.org/10.1002/jobm.201300072>
- Moreira, I. M. D. V., Vilela, L. D. F., Miguel, M. G. D. C. P., Santos, C., Lima, N., & Schwan, R. F. (2017). Impact of a microbial cocktail used as a starter culture on cocoa fermentation and chocolate flavor. *Molecules*, 22(5). <http://doi.org/10.3390/molecules22050766>
- Moreira, I. M. da V., Miguel, M. G. da C. P., Duarte, W. F., Dias, D. R., & Schwan, R. F. (2013). Microbial succession and the dynamics of metabolites and sugars during the fermentation of three different cocoa (*Theobroma cacao* L.) hybrids. *Food Research International*, 54(1), 9–17. <http://doi.org/10.1016/j.foodres.2013.06.001>
- Motamayor, J. C., Risterucci, A. M., Lopez, P. A., Ortiz, C. F., Moreno, A., & Lanaud, C. (2002). Cacao domestication I: the origin of the cacao cultivated by the Mayas. *Heredity*, 89(5), 380–386. <http://doi.org/10.1038/sj.hdy.6800156>
- Naga Padma, P., Anuradha, K., & Reddy, G. (2011). Pectinolytic yeast isolates for cold-active polygalacturonase production. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 12(2), 178–181. <http://doi.org/10.1016/j.ifset.2011.02.001>
- Nakagawa, T., Nagaoka, T., Taniguchi, S., Miyaji, T., & Tomizuka, N. (2004). Isolation and characterization of psychrophilic yeasts producing cold-adapted pectinolytic enzymes. *Letters in Applied Microbiology*, 38(5), 383–387. <http://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2004.01503.x>
- Nakano, S., Ugwu, C. U., & Tokiwa, Y. (2012). Efficient production of d-(-)-lactic acid from broken rice by *Lactobacillus delbrueckii* using Ca(OH)₂ as a neutralizing agent. *Bioresource Technology*, 104, 791–794. <http://doi.org/10.1016/j.biortech.2011.10.017>
- Nandan, A., Gaurav, A., Pandey, A., & Nampoothiri, K. M. (2011). Arginine specific aminopeptidase from *Lactobacillus brevis*. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 54(1), 133–140. <http://doi.org/10.1590/S1516-89132011000100018>

- Navarro, D., Mateo, E., Torija, M., & Mas, A. (2013). Acetic acid bacteria in grape must. *Acetic Acid Bacteria*, 2(1s), 4. <http://doi.org/10.4081/aab.2013.s1.e4>
- Navia, J. F. (2015). Mejoramiento De La Productividad Y Calidad Sensorial (Aroma Y Sabor) Del Cacao Regional Del Departamento De Nariño, 5. Retrieved from http://www.ucc.edu.co/pasto/prensa/2014/Documents/15-Resumen_Proyecto_Calidad_cacao.pdf
- 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. <http://doi.org/10.1016/j.indcrop.2006.03.013>
- Nielsen, D. S. (2006). *The microbiology of Ghanaian cocoa fermentations*. Food Microbiology. The Royal Veterinary and Agricultural University Denmark.
- Nielsen, D. S., Teniola, O. D., Ban-Koffi, L., Owusu, M., Andersson, T. S., & Holzapfel, W. H. (2007). The microbiology of Ghanaian cocoa fermentations analysed using culture-dependent and culture-independent methods. *International Journal of Food Microbiology*, 114(2), 168–186. <http://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2006.09.010>
- Ohmori, S., Uozumi, T., & Beppu, T. (1982). Loss of acetic acid resistance and ethanol oxidizing ability in an *Acetobacter* strain. *Agricultural and Biological Chemistry*, 46(2), 381–389. <http://doi.org/10.1080/00021369.1982.10865082>
- Organization International Cocoa, (ICCO). (2017). *Informe Anual*. Abidjan.
- Ortiz de Bertorelli, L., Graziani de Fariñas, L., & Rovedas, G. (2009). Influencia de varios factores sobre características del grano de cacao fermentado y secado al sol. *Agronomía Tropical*, 59, 119–127.
- Ouattara, D. H., Ouattara, H. G., Kouame, L. M., Goualie, B. G., & Niamke, S. L. (2014). Biochemical and functional properties of lactic acid bacteria isolated from Ivorian cocoa fermenting beans. *Journal of Applied Biosciences*, 77(1), 6489. <http://doi.org/10.4314/jab.v77i1.9>
- 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(November), 11–19. <http://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2017.05.008>
- 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. <http://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. <http://doi.org/10.1128/AEM.05523-11>

- Papalexandratou, Z., Vrancken, G., de Bruyne, K., Vandamme, P., & de Vuyst, L. (2011a). Spontaneous organic cocoa bean box fermentations in Brazil are characterized by a restricted species diversity of lactic acid bacteria and acetic acid bacteria. *Food Microbiology*, 28(7), 1326–1338. <http://doi.org/10.1016/j.fm.2011.06.003>
- Papalexandratou, Z., Vrancken, G., de Bruyne, K., Vandamme, P., & de Vuyst, L. (2011b). Spontaneous organic cocoa bean box fermentations in Brazil are characterized by a restricted species diversity of lactic acid bacteria and acetic acid bacteria. *Food Microbiology*, 28(7), 1326–1338. <http://doi.org/10.1016/j.fm.2011.06.003>
- Peev, B., Rumenova, T. Y., Lubomirova, V., Bagdassarian, C., Petrova, T., Asenova, J., & Stoichev, A. (2017). Comparative study on lactic acid production of different lactic acid bacteria through RP-HPLC method. *Emer Life Sci Res*, 3(1), 11–17. <http://doi.org/http://dx.doi.org/10.7324/ELSR.2017.311117>
- Perdomo, M. (2012). *Caracterización de la Cadena de Abastecimiento y la Cadena de Valor del Cacao en Colombia*. Pontificia Universidad Javeriana. <http://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004>
- Pereira, G. V. de M., Miguel, M. G. da C. P., Ramos, Cí. L., & Schwan, R. F. (2012). Microbiological and physicochemical characterization of small-scale cocoa fermentations and screening of yeast and bacterial strains to develop a defined starter culture. *Applied and Environmental Microbiology*, 78(15), 5395–5405. <http://doi.org/10.1128/AEM.01144-12>
- Pereira, G. V. M. (2012). *Microbiological and Physicochemical Performance of Cocoa Bean Fermentations Carried Out in Different Systems and Screening of Yeast and Bacteria Strains Toward Development of a Starter Culture*. Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós- Graduação em Microbiologia Agrícola.
- Pereira, G. V. M., Alvarez, J. P., Neto, D. P. de C., Soccol, V. T., Tanobe, V. O. A., Rogez, H., ... Soccol, C. R. (2017). Great intraspecies diversity of *Pichia kudriavzevii* in cocoa fermentation highlights the importance of yeast strain selection for flavor modulation of cocoa beans. *Lwt*, 84, 290–297. <http://doi.org/10.1016/j.lwt.2017.05.073>
- Pettipher, G. . L. (1986). An improved method for the extraction and quantitation of anthocyanins in cocoa beans and its use as an index of the degree of fermentation. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 37(3), 289–296. <http://doi.org/10.1002/jsfa.2740370314>
- Pipitone, L. (2016). *Overview of cocoa supply and demand ICCO Cocoa Market Outlook Conference Trend in supply & demand*.
- Quezada, L., Quevedo, J., & García, R. (2017). Determinación del efecto del grado de madurez de las mazorcas en la producción y la calidad sensorial de (*Theobroma cacao* L.). *Revista Científica Agroecosistemas*, 5(1), 36–46.

[http://doi.org/ISSN: 2415-2862](http://doi.org/ISSN:2415-2862)

- Quintero, M. L., & Díaz, K. M. (2004). *El mercado mundial de cacao. Agroalimentaria*. Retrieved from http://www.scielo.org.ve/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1316-03542004000100004&lng=es&tlng=es
- Rama Krishna Ganduri, V. S., Sambasiva Rao, K. R. S., Mangamuri, U. K., Vijaya Lakahmi, M., & Poda, S. (2016). Production of pullulan using jaggery as substrate by *Aureobasidium pullulans* MTCC 2195. *Current Trends in Biotechnology and Pharmacy*, 10(2), 153–160.
- Ramos, C. L., Dias, D. R., Miguel, M. G. da C. P., & Schwan, R. F. (2014). Impact of different cocoa hybrids (*Theobroma cacao* L.) and *S. cerevisiae* UFLA CA11 inoculation on microbial communities and volatile compounds of cocoa fermentation. *Food Research International*, 64, 908–918. <http://doi.org/10.1016/j.foodres.2014.08.033>
- Rodriguez-Campos, J., Escalona-Buendía, H. B., Orozco-Avila, I., Lugo-Cervantes, E., & Jaramillo-Flores, M. E. (2011). Dynamics of volatile and non-volatile compounds in cocoa (*Theobroma cacao* L.) during fermentation and drying processes using principal components analysis. *Food Research International*, 44(1), 250–258. <http://doi.org/10.1016/j.foodres.2010.10.028>
- Romero Cortes, T., Robles Olvera, V., Rodriguez Jimenes, G., & Ramiñez Lepe, M. (2012). Isolation and characterization of acetic acid bacteria in cocoa fermentation. *African Journal of Microbiology Research*, 6(2), 339–347. <http://doi.org/10.5897/AJMR11.986>
- Ruíz Pinargote, M. A., Mera Morán, O. L., Prado Cedeño, Á. de J., & Cedeño Guzmán, W. P. (2015). INFLUENCIA DE LA ÉPOCA DE COSECHA EN LA CALIDAD DEL LICOR DE CACAO TIPO NACIONAL. *Espamciencia*, 5(2), 73–85. Retrieved from <http://investigacion.esпам.edu.ec/index.php/Revista/article/view/121>
- Saltini, R., Akkerman, R., & Frosch, S. (2013). Optimizing chocolate production through traceability: A review of the influence of farming practices on cocoa bean quality. *Food Control*, 29(1), 167–187. <http://doi.org/10.1016/j.foodcont.2012.05.054>
- Sanchez, J., Guiraud, J. P., & Galzy, P. (1984). A study of the polygalacturonase activity of several yeast strains isolated from cocoa. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 20(4), 262–267. <http://doi.org/10.1007/BF00250636>
- Sánchez Vargas, A. D. P., Castellanos Domínguez, O. F., & Domínguez Martínez, K. P. (2008). Mejoramiento de la poscosecha del cacao a partir del roadmapping. *Revista Ingeniería E Investigación*, 28(3), 150–158.
- 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.

<http://doi.org/10.1016/j.lwt.2015.09.002>

- Schinella, G., Mosca, S., Cienfuegos-Jovellanos, E., Pasamar, M. Á., Muguerza, B., Ramón, D., & Ríos, J. L. (2010). Antioxidant properties of polyphenol-rich cocoa products industrially processed. *Food Research International*, 43(6), 1614–1623. <http://doi.org/10.1016/j.foodres.2010.04.032>
- Schwan, R. F. (1998). Cocoa fermentations conducted with a defined microbial cocktail inoculum. *Applied and Environmental Microbiology*, 64(4), 1477–1483. <http://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004>
- Schwan, R. F., Cooper, R. M., & Wheals, A. E. (1997). Endopolygalacturonase secretion by *Kluyveromyces marxianus* and other cocoa pulp-degrading yeasts. *Enzyme and Microbial Technology*, 21(4), 234–244. [http://doi.org/10.1016/S0141-0229\(96\)00261-X](http://doi.org/10.1016/S0141-0229(96)00261-X)
- Schwan, R. F., & Fleet, G. H. (2015). *Cocoa and Coffe Fermentations*. CRC Pres.
- Schwan, R. F., & Rose, A. H. (1994). Polygalacturonase production by *Kluyveromyces marxianus*: effect of medium composition. *Journal of Applied Bacteriology*, 76(1), 62–67. <http://doi.org/10.1111/j.1365-2672.1994.tb04416.x>
- 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. <http://doi.org/10.1080/10408690490464104>
- Selmi, C., Mao, T. K., Keen, C. L., Schmitz, H. H., & Gershwin, M. E. (2006). The Anti-inflammatory Properties of Cocoa Flavanols, 47, 163–171.
- Soares, M. M. C. N., Da Silva, R., & Gomes, E. (1999). Screening of Bacterial Strains for Pectinolytic Activity : Characterization of the Polygalacturonase Produced By *Bacillus* Sp. *Revista de Microbiologia*, 30, 299–303. <http://doi.org/10.1590/S0001-37141999000400002>
- Soumahoro, S., Goualie, B. G., Adom, J. N., Ouattara, H. G., Koua, G., Doue, G. G., & Niamke, S. L. (2015). Effects of culture conditions on acetic acid production by bacteria isolated from Ivoirian fermenting cocoa (*Theobroma cacao* L .) beans. *Journal of Applied Biosciences*, 95, 8981–8988. Retrieved from <http://m.elewa.org/Journals/wp-content/uploads/2015/11/8.-soumahoro.pdf>
- Soumahoro, S., Ouattara, H. G., Goualié, B., Koua, G., Doue, G., & Niamke, S. L. (2015). Occurrence of High Acetic Acid-Producing Bacteria in Ivorian Cocoa Fermentation and Analysis of Their Response to Fermentative Stress. *American Journal of BioScience*, 3(3), 70. <http://doi.org/10.11648/j.ajbio.20150303.12>
- Srikanth, S., Swathi, M., Tejaswini, M., Sharmila, G., Muthukumar, C., Jaganathan, M. K., & Tamilarasan, K. (2014). Statistical optimization of molasses based exopolysaccharide and biomass production by *Aureobasidium pullulans* MTCC 2195. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 3(3), 7–12. <http://doi.org/10.1016/j.bcab.2013.11.011>
- Steinau Dueñas, I. A. (2017). *Evaluación de la incidencia de la fermentación en la*

- calidad del grano de cacao trinitario en caluco, sonsonate, El Salvador*. Tesis de grado, Universidad de El Salvador.
- Taragano, V. (2000). *Pectinasas fúngicas : estudios comparativos de producción por fermentación sumergida y en sustrato sólido y estabilidad en sistemas deshidratados*.
- Turchetti, B., Buzzini, P., Goretti, M., Branda, E., Diolaiuti, G., D'Agata, C., ... Vaughan-Martini, A. (2008). Psychrophilic yeasts in glacial environments of Alpine glaciers. *FEMS Microbiology Ecology*, 63(1), 73–83.
<http://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2007.00409.x>
- Valera, M. J., Laich, F., González, S. S., Torija, M. J., Mateo, E., & Mas, A. (2011). Diversity of acetic acid bacteria present in healthy grapes from the Canary Islands. *International Journal of Food Microbiology*, 151(1), 105–112.
<http://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2011.08.007>
- Vázquez-Ovando, A., Ovando-Medina, I., Adriano-Anaya, L., Betancur-Ancona, D., & Salvador-Figueroa, M. (2016). Alcaloides y polifenoles del cacao, mecanismos que regulan su biosíntesis y sus implicaciones en el sabor y aroma. *Archivos Latinoamericanos de Nutricion*, 66(3), 239–254.
- 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.
<http://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(June), 31–40. <http://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2017.06.004>
- Wood, G. (1984). History and development. In G. Wood & R. Lass (Eds.), *COCOA* (4th, pp. 1–10). Oxford, United Kingdom: Blackwell Science.
- World Cocoa Foundation. (2012). Making Chocolate from Scratch. *Permanent Agriculture Resources*, (May), 23.
- Youssef, F., Biliaderis, C. G., & Roukas, T. (1998). Enhancement of pullulan production by *Aureobasidium pullulans* in batch culture using olive oil and sucrose as carbon sources. *Applied Biochemistry and Biotechnology - Part A Enzyme Engineering and Biotechnology*, 74(1), 13–30.
<http://doi.org/10.1007/BF02786883>

12. ANEXOS

Anexo 1. Media y desviación estándar del diámetro (mm) de colonias de aislados de levaduras de la fermentación de cacao en medio sólido de agar pulpa de cacao (APC) y Pectina

No Aislado	N	Diámetro (mm) en APC	Diámetro (mm) en Pectina
62	5	7,80±1,10	0,54±1,20
63	5	8,27±0,47	10,24±1,21
65	5	13,66±3,40	10,39±0,61
67	5	10,15±1,25	11,32±1,89
73	5	8,38±0,95	11,09±1,37
75	5	10,31±1,68	11,38±0,84
78	5	8,22±1,10	11,98±0,90
87	5	8,35±0,50	14,26±0,94
88	5	8,12±0,43	12,99±0,92
90	5	7,52±0,31	12,48±1,18
92	5	8,27±1,07	19,04±3,82
93	5	8,37±0,61	18,40±3,32
94	5	8,13±0,28	12,57±0,67
95	5	6,93±2,07	20,82±7,26
97	5	8,49±0,73	17,11±2,51
99	5	8,44±0,24	12,80±1,48
Total	80	8,71±1,91	12,96±5,07

Anexo 2. Prueba de Kolmogorov-Smirnov aplicada a diámetro (mm) de colonias de levaduras aisladas de la fermentación de cacao

Prueba de Kolmogorov-Smirnov			
	N	Estadístico	Valor-P
Diametro (mm) en APC	80	0,190	0,006
Diametro (mm) en Pectina	80	0,173	0,017

Anexo 3. Prueba de Levene aplicada a diámetro de colonias de levaduras aisladas de la fermentación de cacao

Prueba de Levene		
	Estadístico	Valor-P
Diametro (mm) en APC	5,637	0,000
Diametro (mm) en Pectina	7,021	0,000

Anexo 4. Prueba de Kruskal-Wallis aplicada a diámetro de colonias de levaduras aisladas de la fermentación de cacao

Prueba de Kruskal-Wallis			
	gl	H	Valor-P
Diámetro (mm) en APC	15	38,207	0,001
Diámetro (mm) en Pectina	15	61,515	0,000

Anexo 5. Comparación de aislados de levaduras de la fermentación de cacao en medio APC

Tratamiento	N	Rango promedio				
90	5	15,50	A			
95	5	16,40	A			
62	5	27,80	A			
88	5	31,70	A			
94	5	33,60	A			
78	5	36,10	A	B		
73	5	36,50	A	B		
63	5	37,60	A	B		
93	5	39,60	A	B	C	
87	5	39,90	A	B	C	
92	5	40,20	A	B	C	
97	5	41,90	A	B	C	
99	5	43,20	A	B	C	
67	5	63,50		B	C	D
75	5	68,10			C	D
65	5	76,40				D

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

Anexo 6. Comparación de aislados de levaduras de la fermentación de cacao en medio de pectina

Tratamiento	N	Rango promedio						
62	5	3,00	A					
63	5	14,90	A	B				
65	5	17,00	A	B				
73	5	24,60	A	B	C			
75	5	26,40	A	B	C			
67	5	28,10	A	B	C			
78	5	33,60		B	C	D		
90	5	40,70		B	C	D	E	
94	5	41,30		B	C	D	E	
99	5	42,20		B	C	D	E	
88	5	46,30			C	D	E	F
87	5	58,60				D	E	F
97	5	64,80					E	F
93	5	66,30					E	F
95	5	69,00					E	F
92	5	71,20						F

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

Anexo 7. Media y desviación estándar de diámetro (mm) de colonias de aislados de levaduras de la filosfera de cacao en medio sólido de agar pulpa de cacao (APC) y pectina

No aislado	N	Diámetro (mm) en APC	Diámetro (mm) en pectina
116	5	9,43±1,28	10,71±0,41
131	5	9,09±1,20	17,50±3,46
134	5	9,60±0,26	11,82±1,84
135	5	8,04±0,74	12,06±1,04
137	5	10,11±1,86	13,56±1,26
140	5	9,11±1,09	10,20±0,99
141	5	8,80±0,78	8,73±0,74
142	5	7,13±0,93	8,16±2,90
163	5	6,14±0,41	17,60±2,38
169	5	12,60±0,29	17,92±1,88
178	5	6,26±0,26	16,82±4,47
303	4	27,13±0,32	15,62±2,65
Total	59	10,00±5,04	13,35±4,07

Anexo 8. Prueba de Kolmogorov-Smirnov aplicada a diámetro (mm) de colonias de levaduras aisladas de la filosfera de cacao

Prueba de Kolmogorov-Smirnov			
	N	Estadístico	Valor-P
Diámetro (mm) en APC	59	0,248	0,001
Diámetro (mm) en Pectina	59	0,105	0,554

Anexo 9. Prueba de Levene aplicada a diámetro (mm) de colonias de levaduras aisladas de la filosfera de cacao

Prueba de Levene		
	Estadístico	Valor-P
Diámetro (mm) en APC	2,515	0,014
Diámetro (mm) en Pectina	2,400	0,019

Anexo 10. Prueba de Kruskal-Wallis aplicada a diámetro (mm) de colonias de levaduras aisladas de la filosfera de cacao

Prueba de Kruskal-Wallis			
	gl	H	Valor-P
Diámetro (mm) en APC	11	46,92	0,000
Diámetro (mm) en Pectina	11	47,88	0,000

Anexo 11. Comparación de levaduras de la filosfera de cacao en medio APC

Tratamiento	N	Rango promedio					
163	5	5,80	A				
178	5	7,00	A				
142	5	13,60	A	B			
135	5	21,40	A	B	C		
141	5	29,70		B	C		
131	5	31,90		B	C	D	
140	5	32,30		B	C	D	
116	5	34,90			C	D	
137	5	39,30			C	D	E
134	5	40,10			C	D	E
169	5	52,00				D	E
303	4	57,50					E

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

Anexo 12. Comparación de aislados de levaduras de la filosfera de cacao en medio de pectina

Tratamiento	N	Rango promedio					
141	5	6,20	A				
142	5	7,60	A				
140	5	14,20	A	B			
116	5	17,40	A	B			
134	5	25,20	A	B	C		
135	5	27,00	A	B	C	D	
137	5	34,60		B	C	D	E
303	5	42,00			C	D	E
178	5	44,40			C	D	E
131	5	46,80				D	E
163	5	46,80				D	E
169	4	50,20					E

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

Anexo 13. Diámetro de halo alrededor de colonia de *Aureobasidium pullulans*

No aislado	Especie	Diámetro de halo (mm)	
		APC	Pectina
303	<i>Aureobasidium pullulans</i>	0	11,03±0,17

Datos presentados como el valor medio de cuatro determinaciones ± desviación estándar.

Anexo 14. Media y desviación estándar de producción de ácido láctico (%p/v) y biomasa (g/L) por bacterias ácido lácticas (BAL) obtenidas de la fermentación de cacao

No aislado	N	Producción de ácido láctico (%)	Biomasa (g/L)
6	3	1,24±0,03	3,11±0,38
7	3	0,88±0,02	3,78±0,39
12	3	1,43±0,05	3,33±0,67
13	3	1,10±0,03	9,11±0,38
24	3	0,89±0,01	10,67±0,67
34	3	0,98±0,05	8,67±0,67
44	3	1,67±0,01	8,44±0,77
46	3	0,92±0,15	3,11±1,02
209	3	1,64±0,03	3,56±0,39
308	3	1,73±0,02	3,33±0,67
309	3	1,70±0,01	2,67±0
314	3	1,70±0,02	4,00±1,33
315	3	1,65±0,05	3,78±0,39
316	3	1,69±0,04	4,00±0
317	3	1,70±0,04	3,56±0,39
Total	45	1,39±0,34	5,01±2,68

Anexo 15. Prueba de Kolmogorov-Smirnov aplicada a producción de ácido láctico (%p/v) y biomasa (g/L) por bacterias ácido lácticas (BAL) obtenidas de la fermentación de cacao

Prueba de Kolmogorov-Smirnov			
	N	Estadístico	Valor-P
Producción de ácido láctico (%)	45	0,259	0,005
Biomasa (g/L)	45	0,357	0,000

Anexo 16. Prueba de Levene aplicada a producción de ácido láctico (%p/v) y biomasa (g/L) por bacterias ácido lácticas (BAL) obtenidas de la fermentación de cacao

Prueba de Levene		
	Estadístico	Valor-P
Producción de ácido láctico (%)	6,226	0,000
Biomasa (g/L)	1,606	0,135

Anexo 17. Prueba de Krukal-Wallis aplicada a producción de ácido láctico (%p/v) y biomasa (g/L) por bacterias ácido lácticas (BAL) obtenidas de la fermentación de cacao

Prueba de Krukal-Wallis			
	gl	H	Valor-P
Producción de ácido láctico (%)	14	40,70	0,0002
Biomasa (g/L)	14	33,93	0,0021

Anexo 18. Comparación de producción de ácido láctico (%p/v) por bacterias ácido lácticas (BAL) obtenidas de la fermentación de cacao

Tratamiento	N	Rango promedio					
7	3	4,83	A				
46	3	5,67	A				
24	3	6,17	A				
34	3	10,00	A	B			
13	3	13,33	A	B	C		
6	3	17,00	A	B	C	D	
12	3	20,00	A	B	C	D	
209	3	24,50	A	B	C	D	E
315	3	27,83		B	C	D	E
44	3	30,00		B	C	D	E
316	3	33,50			C	D	E
317	3	36,33				D	E
314	3	36,50				D	E
309	3	37,17				D	E
308	3	42,17					E

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

Anexo 19. Comparación de biomasa (g/L) de bacterias ácido lácticas (BAL) obtenidas de la fermentación de cacao

Tratamiento	N	Rango promedio				
309	3	5,00	A			
6	3	11,00	A			
46	3	13,67	A			
12	3	15,00	A			
308	3	15,00	A			
209	3	18,00	A	B		
317	3	18,00	A	B		
314	3	21,33	A	B	C	
315	3	22,00	A	B	C	
7	3	22,00	A	B	C	
316	3	26,00	A	B	C	D
44	3	36,83		B	C	D
34	3	37,67		B	C	D
13	3	39,50			C	D
24	3	44,00				D

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

Anexo 20. Media y desviación estándar de producción de ácido acético (%p/v) y biomasa (g/L) por bacterias ácido acéticas obtenidas de la fermentación de cacao

No aislado	n	Producción de ácido acético (%)	Biomasa (g/L)
286	3	0,31±0,01	4,13±0,23
287	3	0,32±0	4,80±0,40
307	3	0,28±0,02	5,60±0
310	3	0,29±0,04	5,20±0,69
311	3	0,29±0,01	5,47±0,23
312	3	0,32±0,01	5,47±0,46
313	3	0,32±0,02	5,20±0
Total	21	0,31±0,02	5,12±0,57

Anexo 21. Prueba de Shapiro-Wilks aplicada a producción de ácido acético (%p/v) y biomasa (g/L) por bacterias ácido acéticas (BAA) obtenidas de la fermentación de cacao

Prueba de Shapiro-Wilks			
	N	Estadístico	Valor-P
Producción de ácido acético (%)	21	0,929	0,133
Biomasa (g/L)	21	0,871	0,009

Anexo 22. Prueba de Levene aplicada a producción de ácido acético (%p/v) y biomasa (g/L) por bacterias ácido acéticas (BAA) obtenidas de la fermentación de cacao

Prueba de Levene		
	Estadístico	Valor-P
Producción de ácido acético (%)	5,811	0,003
Biomasa (g/L)	5,389	0,004

Anexo 23. Prueba de Kruskal-Wallis aplicada a producción de ácido acético (%p/v) y biomasa (g/L) por bacterias ácido acéticas (BAA) obtenidas de la fermentación de cacao

Prueba de Kruskal-Wallis			
	gl	H	Valor-P
Producción de ácido acético (%)	6	10,078	0,121
Biomasa (g/L)	6	13,005	0,043

Anexo 24. Comparación de biomasa (g/L) por bacterias ácido acéticas (BAA) obtenidas de la fermentación de cacao

Tratamiento	N	Rango promedio			
286	3	2,33	A		
287	3	6,67	A	B	
313	3	10,00	A	B	C
310	3	12,67		B	C
312	3	13,67		B	C
311	3	14,67		B	C
307	3	17,00			C

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

Anexo 25. Media y desviación estándar de biomasa (g/L) de *Aureobasidium pullulans*

Tratamiento	N	Biomasa (g/L)
24h-pH 3,5	3	1,21±0,18
24h-pH 4,5	3	1,91±0,62
24h-pH 5,5	3	2,56±0,61
24h-pH 6,5	3	2,35±0,84
72h-pH 3,5	3	2,22±0,86
72h-pH 4,5	3	2,42±1,05
72h-pH 5,5	3	2,24±0,27
72h-pH 6,5	3	2,82±0,49
120h-pH 3,5	3	2,01±0,32
120h-pH 4,5	3	2,68±0,28
120h-pH 5,5	3	2,59±0,30
120h-pH 6,5	3	2,68±0,34
168h-pH 3,5	3	2,51±0,10
168h-pH 4,5	3	3,05±0,50
168h-pH 5,5	3	3,4±0,77
168h-pH 6,5	3	3,27±0,10
Total	48	2,50±0,69

Anexo 26. Prueba de normalidad para biomasa (g/L) del *Aureobasidium pullulans*

Prueba	Estadístico	Valor-P
Estadístico W de Shapiro-Wilk	0,967	0,309
Kolmogorov-Smirnov	0,101	0,713

Anexo 27. Verificación de varianza para biomasa (g/L) de *Aureobasidium pullulans*

	Prueba	Valor-P
Levene's	2,272	0,025
de Bartlett	2,053	0,190

Anexo 28. Análisis de varianza para biomasa (g/L) de *Aureobasidium pullulans*

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	12,916	15	0,861	2,82	0,0067
Intra grupos	9,766	32	0,305		
Total (Corr.)	22,681	47			

Anexo 29. Prueba de Tukey para biomasa (g/L) de *Aureobasidium pullulans*

Tratamiento	Casos	Medias	Grupos Homogéneos
168h-pH 5,5	3	3,4	A
168h-pH 6,5	3	3,27	A
168h-pH 4,5	3	3,05	A
72h-pH 6,5	3	2,82	AB
120h-pH 6,5	3	2,68	AB
120h-pH 4,5	3	2,68	AB
120h-pH 5,5	3	2,59	AB
24h-pH 5,5	3	2,56	AB
168h-pH 3,5	3	2,51	AB
72h-pH 4,5	3	2,42	AB
24h-pH 6,5	3	2,35	AB
72h-pH 5,5	3	2,24	AB
72h-pH 3,5	3	2,22	AB
120h-pH 3,5	3	2,01	AB
24h-pH 4,5	3	1,91	AB
24h-pH 3,5	3	1,21	B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($P > 0,05$)

Anexo 30. Media y desviación estándar de concentración (mg/mL) de pectinasas

Tratamiento	N	Concentración (mg/mL)
24h-pH 3,5	3	3,15±0,31
24h-pH 4,5	3	2,97±0,45
24h-pH 5,5	3	2,44±0,17
24h-pH 6,5	3	2,74±0,36
72h-pH 3,5	3	2,25±0,18
72h-pH 4,5	3	2,25±0,23
72h-pH 5,5	3	2,14±0,86
72h-pH 6,5	3	2,27±0,14
120h-pH 3,5	3	3,51±1,06
120h-pH 4,5	3	3,53±1,44
120h-pH 5,5	3	2,96±0,35
120h-pH 6,5	3	3,12±0,43
168h-pH 3,5	3	3,78±0,87
168h-pH 4,5	3	1,96±0,12
168h-pH 5,5	3	2,41±0,5
168h-pH 6,5	3	2,35±0,96
Total	48	2,74±0,77

Anexo 31. Prueba de normalidad para concentración (mg/mL) de pectinasas

Prueba	Estadístico	Valor-P
Estadístico W de Shapiro-Wilk	0,929	0,008
Kolmogorov-Smirnov	0,106	0,651

Anexo 32. Verificación de varianza para concentración (mg/mL) de pectinasas

	Prueba	Valor-P
Levene's	3,030	0,004
de Bartlett	2,591	0,039

Anexo 33. Análisis de varianza para concentración (mg/mL) de pectinasas

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	14,170	15	0,945	2,24	0,0271
Intra grupos	13,480	32	0,421		
Total (Corr.)	27,650	47			

Anexo 34. Prueba de Tukey para concentración (mg/mL) de pectinasas

Tratamiento	Casos	Media	Grupos Homogéneos
168h-pH 3,5	3	3,78	A
120h-pH 4,5	3	3,53	A
120h-pH 3,5	3	3,51	A
24h-pH 3,5	3	3,15	A
120h-pH 6,5	3	3,12	A
24h-pH 4,5	3	2,97	A
120h-pH 5,5	3	2,96	A
24h-pH 6,5	3	2,74	A
24h-pH 5,5	3	2,44	A
168h-pH 5,5	3	2,41	A
168h-pH 6,5	3	2,35	A
72h-pH 6,5	3	2,27	A
72h-pH 3,5	3	2,25	A
72h-pH 4,5	3	2,25	A
72h-pH 5,5	3	2,14	A
168h-pH 4,5	3	1,96	A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($P > 0,05$)

Anexo 35. Media y desviación estándar de proteína ($\mu\text{g/mL}$)

Tratamiento	N	Proteína($\mu\text{g/mL}$)
24h-pH 3,5	3	37,92 \pm 9,20
24h-pH 4,5	3	40,85 \pm 14,40
24h-pH 5,5	3	52,19 \pm 3,61
24h-pH 6,5	3	45,12 \pm 14,44
72h-pH 3,5	3	39,25 \pm 11,48
72h-pH 4,5	3	39,25 \pm 5,69
72h-pH 5,5	3	50,59 \pm 17,45
72h-pH 6,5	3	51,79 \pm 10,46
120h-pH 3,5	3	42,59 \pm 6,82
120h-pH 4,5	3	39,52 \pm 14,22
120h-pH 5,5	3	50,59 \pm 4,28
120h-pH 6,5	3	51,52 \pm 14,03
168h-pH 3,5	3	31,12 \pm 1,74
168h-pH 4,5	3	30,99 \pm 1,62
168h-pH 5,5	3	38,59 \pm 9,21
168h-pH 6,5	3	39,52 \pm 8,21
Total	48	42,59 \pm 10,96

Anexo 36. Prueba de normalidad para proteína ($\mu\text{g/mL}$)

Prueba	Estadístico	Valor-P
Estadístico W de Shapiro-Wilk	0,954	0,099
Kolmogorov-Smirnov	0,098	0,746

Anexo 37. Verificación de varianza para proteína ($\mu\text{g/mL}$)

	Prueba	Valor-P
Levene's	1,570	0,139
de Bartlett	1,900	0,293

Anexo 38. Análisis de varianza para proteína ($\mu\text{g/mL}$)

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	2216,64	15	147,776	1,38	0,216
Intra grupos	3426,99	32	107,093		
Total (Corr.)	5643,63	47			

Anexo 39. Prueba de Tukey para proteína ($\mu\text{g/mL}$)

Tratamiento	N	Medias	Grupos homogéneos
24h-pH 5,5	3	52,19	A
72h-pH 6,5	3	51,79	A
120h-pH 6,5	3	51,52	A
120h-pH 5,5	3	50,59	A
72h-pH 5,5	3	50,59	A
24h-pH 6,5	3	45,12	A
120h-pH 3,5	3	42,59	A
24h-pH 4,5	3	40,85	A
120h-pH 4,5	3	39,52	A
168h-pH 6,5	3	39,52	A
72h-pH 3,5	3	39,25	A
72h-pH 4,5	3	39,25	A
168h-pH 5,5	3	38,59	A
24h-pH 3,5	3	37,92	A
168h-pH 3,5	3	31,12	A
168h-pH 4,5	3	30,99	A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($P > 0,05$)

Anexo 40. Media y desviación estándar de actividad de poligalacturonasa (U/mL)

Tratamiento	N	Act pectinasa (U/mL)
24h-pH 3,5	3	1,42 \pm 0,09
24h-pH 4,5	3	1,47 \pm 0,10
24h-pH 5,5	3	1,77 \pm 0,25
24h-pH 6,5	3	2,17 \pm 0,04
72h-pH 3,5	3	1,45 \pm 0,07
72h-pH 4,5	3	1,17 \pm 0,13
72h-pH 5,5	3	0,79 \pm 0,02
72h-pH 6,5	3	1,54 \pm 0,19
120h-pH 3,5	3	0,85 \pm 0,07
120h-pH 4,5	3	0,78 \pm 0,09
120h-pH 5,5	3	0,9 \pm 0,01
120h-pH 6,5	3	1,11 \pm 0,14
168h-pH 3,5	3	1,46 \pm 0,13
168h-pH 4,5	3	1,72 \pm 0,01
168h-pH 5,5	3	1,85 \pm 0,07
168h-pH 6,5	3	1,75 \pm 0,13
Total	48	1,39 \pm 0,42

Anexo 41. Prueba de normalidad para actividad de poligalacturonasa (U/mL)

Prueba	Estadístico	Valor-P
Estadístico W de Shapiro-Wilk	0,945	0,038
Kolmogorov-Smirnov	0,117	0,548

Anexo 42. Verificación de varianza para actividad de poligalacturonasa (U/mL)

	Prueba	Valor-P
	Levene's	1,376
	de Bartlett	3,212
		0,218
		0,007

Anexo 43. Análisis de varianza para actividad de poligalacturonasa (U/mL)

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	7,916	15	0,528	41,29	0
Intra grupos	0,409	32	0,013		
Total (Corr.)	8,325	47			

Anexo 44. Prueba de Tukey para actividad de poligalacturonasa (U/mL)

Tratamiento	Casos	Media	Grupos homogéneos
24h-pH 6,5	3	2,17	A
168h-pH 5,5	3	1,85	AB
24h-pH 5,5	3	1,77	BC
168h-pH 6,5	3	1,75	BCD
168h-pH 4,5	3	1,72	BCD
72h-pH 6,5	3	1,54	BCD
24h-pH 4,5	3	1,47	CDE
168h-pH 3,5	3	1,46	CDE
72h-pH 3,5	3	1,45	CDEF
24h-pH 3,5	3	1,42	DEF
72h-pH 4,5	3	1,17	EFG
120h-pH 6,5	3	1,11	FGH
120h-pH 5,5	3	0,9	GH
120h-pH 3,5	3	0,85	GH
72h-pH 5,5	3	0,79	H
120h-pH 4,5	3	0,78	H

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($P > 0,05$)

Anexo 45. Datos de los perfiles sensoriales de los licores de cacao de las diferentes mezclas de microorganismos en el día 7 de la microfermentación

TRATAMIENTO	CACAO	ACIDEZ	ASTRINGENTE	AMARGO	FRUTAL	FLORAL	VERDE	NUEZ	PANELA MALTA
CONTROL	3,11	1,89	2,22	2,44	1,44	1,33	0,44	2,67	1,44
1:1:1	3,56	2,78	2,89	3,11	1,78	0,56	0,44	1,33	0,56
1:2:1	3,78	2,89	2,78	2,67	3,11	0,44	0,11	1,67	1,44
1:1:2	3,33	4,00	3,11	3,00	2,22	0,22	0,56	0,67	1,00
1:2:2	4,00	3,44	2,56	1,67	3,44	0,78	0,11	2,00	1,22
2:1:1	3,56	3,22	2,89	3,22	1,89	0,56	0,22	1,67	1,00
2:1:2	3,89	2,00	1,78	1,89	3,33	0,56	0,00	1,89	1,78
2:2:1	3,44	2,33	2,11	2,56	2,00	0,22	0,33	2,22	1,67
2:2:2	3,67	2,89	2,89	2,78	2,00	0,33	0,44	1,78	1,11

Anexo 46. Prueba de normalidad para pH en el día 1 de la macrofermentación

Prueba	Estadístico	Valor-P
Estadístico W de Shapiro-Wilk	0,922	0,515

Anexo 47. Verificación de varianza para pH en el día 1 de la macrofermentación

	Prueba	Valor-P
Levene's	1,786	0,252
de Bartlett	1,438	0,281

Anexo 48. Análisis de varianza para pH en el día 1 de la macrofermentación

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	0,003	1	0,003	0,98	0,377
Intra grupos	0,013	4	0,003		
Total (Corr.)	0,017	5			

Anexo 49. Prueba de Tukey para pH en el día 1 de la macrofermentación

Tratamiento	Casos	Media	Grupos Homogéneos
Mezcla	3	6,257	A
Control	3	6,210	A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($P > 0,05$)

Anexo 50. Prueba de normalidad para pH en el día 2 de la macrofermentación

Prueba	Estadístico	Valor-P
Estadístico W de Shapiro-Wilk	0,891	0,317

Anexo 51. Verificación de varianza para pH en el día 2 de la macrofermentación

	Prueba	Valor-P
Levene's	3,093	0,153
de Bartlett	1,806	0,169

Anexo 52. Análisis de varianza para pH en el día 2 de la macrofermentación

Fuente	Suma de Cuadrados	GI	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	0,037	1	0,037	1,49	0,289
Intra grupos	0,099	4	0,025		
Total (Corr.)	0,136	5			

Anexo 53. Prueba de Tukey para pH en el día 2 de la macrofermentación

Tratamiento	Casos	Media	Grupos Homogéneos
Control	3	6,047	A
Mezcla	3	5,890	A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($P > 0,05$)

Anexo 54. Prueba de normalidad para pH en el día 3 de la macrofermentación

Prueba	Estadístico	Valor-P
Estadístico W de Shapiro-Wilk	0,912	0,433

Anexo 55. Verificación de varianza para pH en el día 3 de la macrofermentación

	Prueba	Valor-P
Levene's	1,955	0,235
de Bartlett	1,268	0,383

Anexo 56. Análisis de varianza para pH en el día 3 de la macrofermentación

Fuente	Suma de Cuadrados	GI	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	0,742	1	0,742	29,64	0,006
Intra grupos	0,100	4	0,025		
Total (Corr.)	0,842	5			

Anexo 57. Prueba de Tukey para pH en el día 3 de la macrofermentación

Tratamiento	Casos	Media	Grupos Homogéneos
Control	3	5,647	A
Mezcla	3	4,943	B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($P > 0,05$)

Anexo 58. Prueba de normalidad para pH en el día 4 de la macrofermentación

Prueba	Estadístico	Valor-P
Estadístico W de Shapiro-Wilk	0,757	0,024

Anexo 59. Verificación de varianza para pH en el día 4 de la macrofermentación

	Prueba	Valor-P
	Levene's	8,566
	de Bartlett	3,190
		0,043
		0,054

Anexo 60. Análisis de varianza para pH en el día 4 de la macrofermentación

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	0,0384	1	0,0384	3,63	0,1295
Intra grupos	0,0423333	4	0,0105833		
Total (Corr.)	0,0807333	5			

Anexo 61. Prueba de Tukey para pH en el día 4 de la macrofermentación

Tratamiento	Casos	Media	Grupos Homogéneos
Mezcla	3	4,693	A
Control	3	4,533	A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($P > 0,05$)

Anexo 62. Prueba de normalidad para pH en el día 5 de la macrofermentación

Prueba	Estadístico	Valor-P
Estadístico W de Shapiro-Wilk	0,967	0,869

Anexo 63. Verificación de varianza para pH en el día 5 de la macrofermentación

	Prueba	Valor-P
Levene's	0,448	0,540
de Bartlett	1,088	0,603

Anexo 64. Análisis de varianza para pH en el día 5 de la macrofermentación

Fuente	Suma de Cuadrados	GI	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	0,680	1	0,680	12,01	0,026
Intra grupos	0,226	4	0,057		
Total (Corr.)	0,907	5			

Anexo 65. Prueba de Tukey para pH en el día 5 de la macrofermentación

Tratamiento	Casos	Media	Grupos Homogéneos
Mezcla	3	5,183	A
Control	3	4,510	B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($P > 0,05$)

Anexo 66. Prueba de normalidad para pH en el día 6 de la macrofermentación

Prueba	Estadístico	Valor-P
Estadístico W de Shapiro-Wilk	0,853	0,159

Anexo 67. Verificación de varianza para pH en el día 6 de la macrofermentación

	Prueba	Valor-P
Levene's	3,529	0,134
de Bartlett	1,312	0,351

Anexo 68. Análisis de varianza para pH en el día 6 de la macrofermentación

Fuente	Suma de Cuadrados	GI	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	0,282	1	0,282	6,88	0,059
Intra grupos	0,164	4	0,041		
Total (Corr.)	0,446	5			

Anexo 69. Prueba de Tukey para pH en el día 6 de la macrofermentación

Tratamiento	Casos	Media	Grupos Homogéneos
Mezcla	3	4,870	A
Control	3	4,437	A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($P > 0,05$)

Anexo 70. Prueba de normalidad para pH en el día 7 de la macrofermentación

Prueba	Estadístico	Valor-P
Estadístico W de Shapiro-Wilk	0,916	0,463

Anexo 71. Verificación de varianza para pH en el día 7 de la macrofermentación

	Prueba	Valor-P
Levene's	0,016	0,904
de Bartlett	1,000	0,973

Anexo 72. Análisis de varianza para pH en el día 7 de la macrofermentación

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	0,0468167	1	0,047	3,43	0,138
Intra grupos	0,0546667	4	0,014		
Total (Corr.)	0,101483	5			

Anexo 73. Prueba de Tukey para pH en el día 7 de la macrofermentación

Tratamiento	Casos	Media	Grupos Homogéneos
Mezcla	3	5,710	A
Control	3	5,533	A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($P > 0,05$)

Anexo 74. Prueba de normalidad para acidez total en el día 1 de la macrofermentación

Prueba	Estadístico	Valor-P
Estadístico W de Shapiro-Wilk	0,866	0,207

Anexo 75. Verificación de varianza para acidez total en el día 1 de la macrofermentación

	Prueba	Valor-P
Levene's	0,400	0,561
de Bartlett	1,155	0,497

Anexo 76. Análisis de varianza para acidez total en el día 1 de la macrofermentación

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	1,66667E-05	1	1,66667E-05	0,25	0,6433
Intra grupos	2,66667E-04	4	6,66667E-05		
Total (Corr.)	2,83333E-04	5			

Anexo 77. Prueba de Tukey para acidez total en el día 1 de la macrofermentación

Tratamiento	Casos	Media	Grupos Homogéneos
Mezcla	3	0,05	A
Control	3	0,05	A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($P > 0,05$)

Anexo 78. Prueba de normalidad para acidez total en el día 2 de la macrofermentación

Prueba	Estadístico	Valor-P
Estadístico W de Shapiro-Wilk	0,79	0,04

Anexo 79. Verificación de varianza para acidez total en el día 2 de la macrofermentación

	Prueba	Valor-P
Levene's	8,471	0,044
de Bartlett	2,125	0,120

Anexo 80. Análisis de varianza para acidez total en el día 2 de la macrofermentación

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	0,001	1	0,0006	2,12	0,219
Intra grupos	0,001	4	0,0003		
Total (Corr.)	0,002	5			

Anexo 81. Prueba de Tukey para acidez total en el día 2 de la macrofermentación

Tratamiento	Casos	Media	Grupos Homogéneos
Mezcla	3	0,08	A
Control	3	0,06	A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($P > 0,05$)

Anexo 82. Prueba de normalidad para acidez total en el día 3 de la macrofermentación

Prueba	Estadístico	Valor-P
Estadístico W de Shapiro-Wilk	0,861	0,184

Anexo 83. Verificación de varianza para acidez total en el día 3 de la macrofermentación

	Prueba	Valor-P
Levene's	11,28	0,03
de Bartlett	4,68	0,03

Anexo 84. Análisis de varianza para acidez total en el día 3 de la macrofermentación

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	0,714	1	0,714	19,76	0,011
Intra grupos	0,145	4	0,036		
Total (Corr.)	0,859	5			

Anexo 85. Prueba de Tukey para acidez total en el día 3 de la macrofermentación

Tratamiento	Casos	Media	Grupos Homogéneos
Mezcla	3	0,82	A
Control	3	0,13	B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($P > 0,05$)

Anexo 86. Prueba de normalidad para acidez total en el día 4 de la macrofermentación

Prueba	Estadístico	Valor-P
Estadístico W de Shapiro-Wilk	0,871	0,227

Anexo 87. Verificación de varianza para acidez total en el día 4 de la macrofermentación

	Prueba	Valor-P
Levene's	0,313	0,606
de Bartlett	1,017	0,818

Anexo 88. Análisis de varianza para acidez total en el día 4 de la macrofermentación

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	0,0054	1	0,005	0,05	0,8407
Intra grupos	0,469733	4	0,117		
Total (Corr.)	0,475133	5			

Anexo 89. Prueba de Tukey para acidez total en el día 4 de la macrofermentación

Tratamiento	Casos	Media	Grupos Homogéneos
Control	3	1,14	A
Mezcla	3	1,08	A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($P > 0,05$)

Anexo 90. Prueba de normalidad para acidez total en el día 5 de la macrofermentación

Prueba	Estadístico	Valor-P
Estadístico W de Shapiro-Wilk	0,964	0,850

Anexo 91. Verificación de varianza para acidez total en el día 5 de la macrofermentación

	Prueba	Valor-P
Levene's	0,390	0,566
de Bartlett	1,091	0,598

Anexo 92. Análisis de varianza para acidez total en el día 5 de la macrofermentación

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	3,405	1	3,405	17,57	0,014
Intra grupos	0,775	4	0,194		
Total (Corr.)	4,180	5			

Anexo 93. Prueba de Tukey para acidez total en el día 5 de la macrofermentación

Tratamiento	Casos	Media	Grupos Homogéneos
Control	3	2,543	A
Mezcla	3	1,037	B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($P > 0,05$)

Anexo 94. Prueba de normalidad para acidez total en el día 6 de la macrofermentación

Prueba	Estadístico	Valor-P
Estadístico W de Shapiro-Wilk	0,900	0,360

Anexo 95. Verificación de varianza para acidez total en el día 6 de la macrofermentación

	Prueba	Valor-P
Levene's	1,415	0,300
de Bartlett	1,101	0,579

Anexo 96. Análisis de varianza para acidez total en el día 6 de la macrofermentación

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	0,595	1	0,595	4,56	0,100
Intra grupos	0,522	4	0,130		
Total (Corr.)	1,117	5			

Anexo 97. Prueba de Tukey para acidez total en el día 6 de la macrofermentación

Tratamiento	Casos	Media	Grupos Homogéneos
Control	3	1,333	A
Mezcla	3	0,703	A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($P > 0,05$)

Anexo 98. Prueba de normalidad para acidez total en el día 7 de la macrofermentación

Prueba	Estadístico	Valor-P
Estadístico W de Shapiro-Wilk	0,798	0,053

Anexo 99. Verificación de varianza para acidez total en el día 1 de la macrofermentación

	Prueba	Valor-P
Levene's	6,145	0,068
de Bartlett	1,687	0,196

Anexo 100. Análisis de varianza para acidez total en el día 1 de la macrofermentación

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	0,001	1	0,001	0,13	0,738
Intra grupos	0,025	4	0,006		
Total (Corr.)	0,026	5			

Anexo 101. Prueba de Tukey para acidez total en el día 7 de la macrofermentación

Tratamiento	Casos	Media	Grupos Homogéneos
Control	3	0,287	A
Mezcla	3	0,263	A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($P > 0,05$)

Anexo 102. Prueba de normalidad para índice de fermentación en el día 1 de la macrofermentación

Prueba	Estadístico	Valor-P
Estadístico W de Shapiro-Wilk	0,933	0,618

Anexo 103. Verificación de varianza para índice de fermentación en el día 1 de la macrofermentación

	Prueba	Valor-P
Levene's	1,241	0,328
de Bartlett	1,087	0,606

Anexo 104. Análisis de varianza para índice de fermentación en el día 1 de la macrofermentación

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	0,00006667	1	0,0000666667	0,17	0,698
Intra grupos	0,00153333	4	0,000383333		
Total (Corr.)	0,0016	5			

Anexo 105. Prueba de Tukey para índice de fermentación en el día 1 de la macrofermentación

Tratamiento	Casos	Media	Grupos Homogéneos
Control	3	0,40	A
Mezcla	3	0,40	A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($P > 0,05$)

Anexo 106. Prueba de normalidad para índice de fermentación en el día 2 de la macrofermentación

Prueba	Estadístico	Valor-P
Estadístico W de Shapiro-Wilk	0,975	0,917

Anexo 107. Verificación de varianza para índice de fermentación en el día 2 de la macrofermentación

	Prueba	Valor-P
Levene's	0,082	0,789
de Bartlett	1,037	0,735

Anexo 108. Análisis de varianza para índice de fermentación en el día 2 de la macrofermentación

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	0,0008	1	0,00082	2,58	0,184
Intra grupos	0,0013	4	0,00032		
Total (Corr.)	0,0021	5			

Anexo 109. Prueba de Tukey para índice de fermentación en el día 2 de la macrofermentación

Tratamiento	Casos	Media	Grupos Homogéneos
Mezcla	3	0,43	A
Control	3	0,41	A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($P > 0,05$)

Anexo 110. Prueba de normalidad para índice de fermentación en el día 3 de la macrofermentación

Prueba	Estadístico	Valor-P
Estadístico W de Shapiro-Wilk	0,875	0,242

Anexo 111. Verificación de varianza para índice de fermentación en el día de 3 de la macrofermentación

	Prueba	Valor-P
Levene's	2,872	0,165
de Bartlett	2,337	0,099

Anexo 112. Análisis de varianza para índice de fermentación en el día 3 de macrofermentación

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	0,020	1	0,020	1,51	0,286
Intra grupos	0,054	4	0,014		
Total (Corr.)	0,074	5			

Anexo 113. Prueba de Tukey para índice de fermentación en el día 3 de la macrofermentación

Tratamiento	Casos	Media	Grupos Homogéneos
Mezcla	3	0,80	A
Control	3	0,68	A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($P > 0,05$)

Anexo 114. Prueba de normalidad para índice de fermentación en el día 4 de la macrofermentación

Prueba	Estadístico	Valor-P
Estadístico W de Shapiro-Wilk	0,917	0,474

Anexo 115. Verificación de varianza para índice de fermentación en el día 4 de la macrofermentación

	Prueba	Valor-P
Levene's	1,241	0,328
de Bartlett	1,186	0,460

Anexo 116. Análisis de varianza para índice de fermentación en el día 4 de la macrofermentación

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	0,025	1	0,025	2,39	0,197
Intra grupos	0,042	4	0,011		
Total (Corr.)	0,068	5			

Anexo 117. Prueba de Tukey para índice de fermentación en el día 4 de la macrofermentación

Tratamiento	Casos	Media	Grupos Homogéneos
Control	3	1,15	A
Mezcla	3	1,02	A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($P > 0,05$)

Anexo 118. Prueba de normalidad para índice de fermentación en el día 5 de la macrofermentación

Prueba	Estadístico	Valor-P
Estadístico W de Shapiro-Wilk	0,871	0,226

Anexo 119. Verificación de varianza para índice de fermentación en el día 5 de la macrofermentación

	Prueba	Valor-P
Levene's	0,027	0,876
de Bartlett	1,010	0,856

Anexo 120. Análisis de varianza para índice de fermentación en el día 5 de la macrofermentación

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	0,003	1	0,003	0,570	0,492
Intra grupos	0,023	4	0,006		
Total (Corr.)	0,026	5			

Anexo 121. Prueba de Tukey para índice de fermentación en el día 5 de la macrofermentación

Tratamiento	Casos	Media	Grupos Homogéneos
Control	3	1,16	A
Mezcla	3	1,11	A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($P > 0,05$)

Anexo 122. Prueba de normalidad par índice de fermentación en el día 6 de la macrofermentación

Prueba	Estadístico	Valor-P
Estadístico W de Shapiro-Wilk	0,877	0,250

Anexo 123. Verificación de varianza para índice de fermentación en el día 6 de la macrofermentación

	Prueba	Valor-P
Levene's	1,321	0,314
de Bartlett	1,177	0,470

Anexo 124. Análisis de varianza para índice de fermentación en el día 6 de la macrofermentación

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	0,0704167	1	0,0704167	1,57	0,279
Intra grupos	0,179867	4	0,0449667		
Total (Corr.)	0,250283	5			

Anexo 125. Prueba de Tukey para índice de fermentación en el día 6 de la macrofermentación

Tratamiento	Casos	Media	Grupos Homogéneos
Control	3	1,40	A
Mezcla	3	1,18	A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($P > 0,05$)

Anexo 126. Prueba de normalidad para índice de fermentación en el día de 7 de la macrofermentación

Prueba	Estadístico	Valor-P
Estadístico W de Shapiro-Wilk	0,967	0,871

Anexo 127. Verificación de varianza para índice de fermentación en el día 7 de la macrofermentación

	Prueba	Valor-P
Levene's	0,054	0,828
de Bartlett	1,029	0,762

Anexo 128. Análisis de varianza para índice de fermentación en el día 7 de la macrofermentación

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	0,120	1	0,120	12,27	0,025
Intra grupos	0,039	4	0,010		
Total (Corr.)	0,160	5			

Anexo 129. Prueba de Tukey para índice fermentación en el día 7 de la macrofermentación

Tratamiento	Casos	Media	Grupos Homogéneos
Control	3	1,33	A
Mezcla	3	1,05	B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($P > 0,05$)

Anexo 130. Valores medios del perfil sensorial de los licores de cacao de la macrofermentación por el efecto de mezcla de microorganismos

TRATAMIENTO	DÍA	CACAO	ACIDEZ	ASTRINGENTE	AMARGO	FRUTAL	FLORAL	VERDE	NUEZ	PANELA/MALTA
CONTROL	6	3,33	2,67	3,67	4,00	0,33	1,67	1,00	1,00	1,33
MEZCLA	6	3,67	1,67	2,67	2,33	0,67	0,67	1,00	1,33	1,33