

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

**Transformaciones bioquímicas asociadas a la calidad de algunos grupos
genéticos de cacao (*Theobroma cacao* L.) mediante un proceso de
fermentación controlada**

Trabajo final de graduación para optar al grado de Licenciatura en Ingeniería Agronómica

Estudiante

Katherine Vanessa Rojas Rojas

Tutor

Carlos Eduardo Hernández Aguirre, Ph.D.

Asesores

Alejandra Mencía Guevara, M.Sc.

Alejandro Vargas Martínez, M.Sc.

Campus Omar Dengo

Heredia, Costa Rica, 2020

Transformaciones bioquímicas asociadas a la calidad de algunos grupos genéticos de cacao (*Theobroma cacao* L.) mediante un proceso de fermentación controlada

Katherine Vanessa Rojas Rojas

Trabajo final de graduación de tesis sometida a consideración del tribunal examinador de la Escuela de Ciencias Agrarias para optar por el grado de Licenciatura en Ingeniería Agronómica

**Trabajo final de graduación presentado como requisito parcial para optar al
grado de licenciada en ingeniería agronómica**

Tribunal Examinador

Dr. Jorge Herrera Murillo
Decano (a) FCTM

Dr. Evelio Granados Carvajal
Director (a) Escuela de Ciencias Agrarias

Carlos Eduardo Hernández Aguirre, Ph.D.
Director de Tesis

Alejandra Mencía Guevara, M.Sc.
Asesora

Alejandro Vargas Martínez, M.Sc
Asesor

Katherine Vanessa Rojas Rojas
Sustentante

DEDICATORIA

A Dios por brindarme salud y las fuerzas para el desarrollo y culminación de este proceso.

A mi mamá, por brindarme siempre su apoyo, y no perder la esperanza en mí.

A mi hermana, por siempre darme sabios consejos, y alentarme a seguir adelante.

A Alejandra Mencía, además de ser mi lectora, por su ayuda y motivación en el proceso de tesis.

AGRADECIMIENTOS

Son muchas las personas que han contribuido al proceso y conclusión de este trabajo.

En primer lugar, quiero agradecer a mi profesor tutor Carlos Hernández Aguirre por darme la oportunidad de trabajar y aprender a usar los equipos y nuevas técnicas de análisis de alimentos en el laboratorio Calidad e Innovación Agroalimentaria (LAB CIAGRO).

A la Escuela de Ciencias Agrarias y el laboratorio CIAGRO por brindarme la ayuda financiera y los recursos necesarios para la realización de la presente investigación.

A mi familia por el apoyo incondicional tanto económico como emocional.

A Alejandra Mencía por su paciencia y dedicación en la enseñanza de técnicas de análisis de alimentos, así como la ayuda brindada en toda la parte experimental y académica de esta tesis.

A Stephanie Orozco Cayasso por toda su colaboración y enseñanza en la parte microbiológica.

A Irena Hilje Rodríguez por su ayuda y enseñanza en la parte de identificación molecular.

A Alejandro Vargas Martínez por asistencia en el análisis estadístico.

RESUMEN

La fermentación de cacao es un proceso de gran importancia para la formación de características aromáticas y sensoriales del cacao. El estudio de la diversidad de microorganismos involucrados en la fermentación ha sido ampliamente estudiado. Se concluye que levaduras, bacterias ácido lácticas y ácido acéticas son las responsables del consumo de los compuestos disponibles en la pulpa. A su vez, se desencadenan reacciones enzimáticas y no enzimáticas que desarrollan los precursores de sabor dentro del grano. Sin embargo, la fermentación de cacao es difícil de controlar debido a la complejidad del proceso y la multitud de variables, entre las cuales es determinante la genética del cultivo. Por lo tanto, el objetivo de esta investigación fue analizar las transformaciones bioquímicas asociadas a la calidad de diferentes grupos genéticos del cacao (*T. cacao* L.) mediante un proceso de micro fermentación controlada. Para ello, se estableció una metodología de micro fermentación, utilizando un cultivo iniciador de *Hanseniaspora opuntiae* aplicado a las 0 h y *Acetobacter* spp. a las 48h, en incubadoras. Se empleó esta metodología en cacaos provenientes de 4 grupos genéticos cultivados en el Jardín Clonal del CATIE; así como el paquete tecnológico implementado por el CATIE e híbridos de diferentes fincas de la zona de Upala. Se analizaron azúcares (glucosa y fructosa), etanol, ácido láctico y acético en pulpa; así como metilxantinas (teobromina y cafeína) y (-)-epicatequina en grano a lo largo de la fermentación, como indicadores de la evolución fermentativa. En ambos ensayos (grupos genéticos del CATIE y cacaos comerciales de la zona Upala) no se encontraron diferencias significativas en el contenido y comportamiento de azúcares, ácidos orgánicos y etanol en pulpa de los genotipos estudiados, a lo largo de la fermentación, pero sí en el tiempo de fermentación. Se observó una disminución de metilxantinas y epicatequina debido a la difusión y oxidación desencadenadas por reacciones enzimáticas y no enzimáticas. El contenido promedio de epicatequina de fermentación resultó ser el compuesto distintivo entre los grupos genéticos del CATIE, y cafeína en los cacaos comerciales. Se concluye que la metodología empleada posee un efecto regulador en el comportamiento de azúcares, ácidos orgánicos y etanol en pulpa de diferentes genéticas a lo largo de la fermentación, así como epicatequina y metilxantinas en grano. Se determinó que las variables climáticas, así como agronómicas tienen un gran peso en el comportamiento de metilxantinas y epicatequina de los diversos genotipos a lo largo de la fermentación. Los resultados de esta tesis apuntan a un primer esfuerzo en la identificación de diferencias determinadas por la genética del cacao en el diseño de tecnologías de fermentación experimental para la producción de cacao con calidad controlada.

Tabla de contenido

1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1 OBJETIVOS.....	4
2. MARCO TEÓRICO	5
2.1 Origen del cacao.....	5
2.2 Mercados y valorización de calidades diferenciadas	5
2.3 Diversidad genética	6
2.3.1 Colecciones de germoplasma en el mundo	7
2.3.2 Grupos genéticos de cacao	7
2.3.2.1 Forastero.....	7
2.3.2.2 Criollo.....	8
2.3.2.3 Trinitario.....	8
2.3.3 Clasificación por nuevas técnicas genómicas	9
2.4. Perfil químico del cacao	9
2.4.1 Calidad del cacao.....	10
2.5 Factores que influyen en la calidad del cacao	11
2.5.1 Importancia de la genética en la calidad del grano de cacao.....	11
2.5.2 Fermentación del cacao	11
2.5.3 Indicadores bioquímicos asociados a la calidad sensorial en la fermentación.....	14
3. METODOLOGÍA	15
3.1 Ubicación del estudio	15
3.1.1 Fase de campo	15
3.1.2 Fase de laboratorio	15
3.2. Selección de muestra en campo.....	15
3.3 Fermentación del cacao	17
3.3.1 Procedimiento del establecimiento del sistema de fermentación controlada	17
3.3.2.1 Aislamiento de microorganismos	17
3.3.2.2 Purificación de microorganismos	18
3.3.2.3 Pruebas de tinción Gram	18
3.3.2.4 Identificación molecular de microorganismos	19
3.3.2.5 Conteo de Unidades Formadoras de Colonias (UFC)	20
3.3.2.6 Proceso de fermentación	21
3.4 Análisis de compuestos químicos.....	24
3.4.1 Reactivos químicos.....	24
3.4.2 Preparación de muestras	24
3.4.3 HPLC para compuestos fenólicos y metilxantinas.....	25

3.4.4 HPLC para azúcares reductores, etanol, ácido láctico y ácido acético	26
3.5 Diseño experimental.....	26
3.6 Análisis de datos.....	27
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	28
4.1 Identificación de los microorganismos aislados e inoculados.....	28
4.2 Comportamiento bioquímico en el sistema de micro fermentación.....	30
4.3 pH en pulpa	32
4.4 Azúcares, etanol y ácidos orgánicos en pulpa durante fermentación de cacao	34
4.5 Metilxantinas (teobromina y cafeína) y epicatequina dentro del grano de cacao durante fermentación.....	42
5. CONCLUSIONES.....	53
6. RECOMENDACIONES	55
6. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	57
7. ANEXOS.....	73

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Acciones analizadas por grupo genético provenientes del Jardín Clonal del CATIE, Turrialba.	16
---	----

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Colonias de las levaduras y bacteria de ácido acético aisladas.....	18
Figura 2. Cuadrantes utilizados en el conteo de Unidades Formadoras de Colonias (UFC).	21
Figura 3. Demostración de la fermentación anaeróbica y mantenidas en hieleras para evitar la contaminación con insectos.....	22
Figura 4. Las fermentaciones aeróbicas en beakers dentro de la incubadora (derecha) y toma de pH de la pulpa (izquierda).....	23
Figura 5. <i>H. opuntiae</i> . Gram negativa. 100X.	28
Figura 6. <i>Acetobacter</i> spp. Gram negativa. 100X.	29
Figura 7. Gráfico del comportamiento del pH en pulpa de los cacaos comerciales estudiados durante la fermentación en función del tiempo. Medias con letra común no son diferentes estadísticamente ($p>0.05$).....	33
Figura 8. Gráfico del comportamiento del pH en pulpa de los grupos genéticos del CATIE estudiados durante la fermentación en función del tiempo. Medias con letra común no son diferentes estadísticamente ($p>0.05$).....	33
Figura 9. Gráfico del comportamiento de azúcares, etanol y ácidos orgánicos en pulpa de los grupos genéticos del CATIE durante la fermentación en función del tiempo. Medias con letra común no son diferentes estadísticamente ($p>0.05$).	35
Figura 10. Gráfico del comportamiento de glucosa, etanol y ácidos orgánicos en pulpa de los cacaos comerciales durante la fermentación en función del tiempo. Medias con letra común no son diferentes estadísticamente ($p>0.05$).	35
Figura 11. Gráfico del comportamiento de fructosa (mg/g) en pulpa de los cacaos comerciales durante la fermentación en función del tiempo. Medias con letra común no son diferentes estadísticamente ($p>0.05$).....	36
Figura 12. Gráfico del comportamiento de teobromina (mUA*s) en grano de los grupos genéticos del CATIE durante la fermentación en función del tiempo. Medias con letra común no son diferentes estadísticamente ($p>0.05$).	43
Figura 13. Gráfico del comportamiento de teobromina (mUA*s) en grano de los cacaos comerciales durante la fermentación en función del tiempo. Medias con letra común no son diferentes estadísticamente ($p>0.05$).	43
Figura 14. Gráfico del comportamiento de cafeína (mg/g) en grano de los grupos genéticos del CATIE durante la fermentación en función del tiempo. Medias con letra común no son diferentes estadísticamente ($p>0.05$).....	44
Figura 15. Gráfico del comportamiento de cafeína (mg/g) en grano de los cacaos comerciales durante la fermentación en función del tiempo. Medias con letra común no son diferentes estadísticamente ($p>0.05$).....	44
Figura 16. Gráfico del comportamiento de epicatequina (mUA*s) en grano de los grupos genéticos del CATIE durante la fermentación en función del tiempo. Medias con letra común no son diferentes estadísticamente ($p>0.05$).	45
Figura 17. Gráfico del comportamiento de epicatequina (mUA*s) en grano de los cacaos comerciales durante la fermentación en función del tiempo. Medias con letra común no son diferentes estadísticamente ($p>0.05$).....	45
Figura 18. Gráfico del contenido promedio de cafeína (mg/g) en grano durante fermentación de cacaos comerciales, (medias con letra común no son diferentes estadísticamente ($p>0.05$))......	51
Figura 19. Gráfico del contenido promedio de epicatequina (mUA*s) en grano durante fermentación de los grupos genéticos del CATIE, (medias con letra común no son diferentes estadísticamente ($p>0.05$)).	51

LISTA DE ANEXOS

Anexo 1. Localización del origen de los individuos analizados. Nota: los colores indican el grupo genético inferido al que pertenecen. Adaptado de Motamayor <i>et al.</i> , 2008.....	73
Anexo 2. Productos de PCR de la levadura inoculada, generados a partir de los imprimadores ITS 4/5 (pozo 1) y LR6/LROR (pozo 4).	73
Anexo 3. Productos de PCR de la levadura inoculada, generados a partir de los imprimadores CA1/CA5R (pozo 6).....	73
Anexo 4. Productos de PCR de la acetobacteria y levadura inoculados, generados a partir de los imprimadores 16S (pozo 6) y CA21/CA22R (pozo 7).....	74
Anexo 5. Mazorcas de la accesión IMC-20, grupo genético Iquitos.	74
Anexo 6. Mazorcas de la accesión IMC-27, grupo genético Iquitos.	74
Anexo 7. Mazorca de la accesión IMC-57, grupo genético Iquitos.	75
Anexo 8. Mazorca de la accesión IMC-45, grupo genético Iquitos.	75
Anexo 9. Mazorcas de la accesión IMC-47, grupo genético Iquitos.	75
Anexo 10. Mazorcas de la accesión IMC-34, grupo genético Iquitos.	76
Anexo 11. Mazorcas de la accesión IMC-16, grupo genético Iquitos.	76
Anexo 12. Mazorcas de la accesión IMC-54, grupo genético Iquitos.	76
Anexo 13. Mazorcas de la accesión IMC-107, grupo genético Iquitos.	77
Anexo 14. Mazorcas de la accesión IMC-17, grupo genético Iquitos.	77
Anexo 15. Mazorcas de la accesión PA-67, grupo genético Marañón.....	77
Anexo 16. Mazorcas de la accesión PA-188, grupo genético Marañón.....	78
Anexo 17. Mazorcas de la accesión PA-150, grupo genético Marañón.....	78
Anexo 18. Mazorcas de la accesión PA-19, grupo genético Marañón.....	78
Anexo 19. Mazorcas de la accesión PA-13, grupo genético Marañón.....	79
Anexo 20. Mazorcas de la accesión PA-44, grupo genético Marañón.....	79
Anexo 21. Mazorcas de la accesión PA-16, PA-56 y PA-70, grupo genético Marañón.....	79
Anexo 22. Mazorcas de la accesión ETT-53, grupo genético Nacional.	80
Anexo 23. Mazorcas de la accesión ETT-58, grupo genético Nacional.	80
Anexo 24. Mazorcas de la accesión UF-705, grupo genético Nacional.....	80
Anexo 25. Mazorcas de la accesión UF-273 T1, grupo genético Nacional.	81
Anexo 26. Mazorcas de la accesión UF-713, grupo genético Nacional.....	81
Anexo 27. Mazorcas de la accesión NA-804, grupo genético Nanay.....	81
Anexo 28. Mazorcas de la accesión Pound-7B, grupo genético Nanay.....	82
Anexo 29. Mazorcas de la accesión Pound-12/A, grupo genético Nanay.	82
Anexo 30. Mazorcas de la accesión NA-756, grupo genético Nanay.....	82
Anexo 31. Mazorcas de la accesión Pound-16A, grupo genético Nanay.....	83
Anexo 32. Mazorcas de la accesión P-20, grupo genético Nanay.	83
Anexo 33. Mazorcas de la accesión NA-387, grupo genético Nanay.....	83
Anexo 34. Mazorcas de la accesión P-7p, grupo genético Nanay.	84
Anexo 35. Mazorcas de la accesión NA-804, grupo genético Nanay.....	84
Anexo 36. Granos de cacao listos para fermentar del grupo genético Nanay, repetición 3.	84
Anexo 37. Mazorcas de clones CATIE: CATIE-R1, el CATIE-R4, el CATIE-R6, el CC-187, el ICS-95 T1 y el PMCT-58 de Guatuso, repetición 1.....	85
Anexo 38. Mazorcas de clones CATIE: CATIE-R1, el CATIE-R4, el CATIE-R6, el CC-187, el ICS-95 T1 y el PMCT-58 de Guatuso, repetición 2.....	85

Anexo 39. Mazorcas de clones CATIE: CATIE-R1, el CATIE-R4, el CATIE-R6, el CC-187, el ICS-95 T1 y el PMCT-58 de Guatuso, repetición 3.....	85
Anexo 40. Mazorcas de clones CATIE: CATIE-R1, el CATIE-R4, el CATIE-R6, el CC-187, el ICS-95 T1 y el PMCT-58 de Upala, repetición 1.....	85
Anexo 41. Mazorcas de clones CATIE: CATIE-R1, el CATIE-R4, el CATIE-R6, el CC-187, el ICS-95 T1 y el PMCT-58 de Upala, repetición 2.....	85
Anexo 42. Mazorcas de clones CATIE: CATIE-R1, el CATIE-R4, el CATIE-R6, el CC-187, el ICS-95 T1 y el PMCT-58 de Upala, repetición 3.....	86
Anexo 43. Mazorcas de Híbridos de Guatuso, repetición 1.....	86
Anexo 44. Mazorcas de Híbridos de Guatuso, repetición 2.....	86
Anexo 45. Mazorcas de Híbridos de Guatuso, repetición 3.....	86
Anexo 46. Mazorcas de Híbridos de Pavas Upala, repetición 1.....	86
Anexo 47. Mazorcas de Híbridos de Pavas Upala, repetición 2.....	87
Anexo 48. Mazorcas de Híbridos de Pavas Upala, repetición 3.....	87
Anexo 49. Mazorcas de Híbridos de Cuatro Bocas Upala, repetición 1.....	87
Anexo 50. Mazorcas de Híbridos de Cuatro Bocas Upala, repetición 2.....	87
Anexo 51. Mazorcas de Híbridos de Cuatro Bocas Upala, repetición 3.....	87
Anexo 52. Prueba de corte de la fermentación del grupo genético del CATIE: Iquitos, repetición 1.....	88
Anexo 53. Prueba de corte de la fermentación del grupo genético del CATIE: Iquitos, repetición 2.....	88
Anexo 54. Prueba de corte de la fermentación del grupo genético del CATIE: Marañón, repetición 1.....	88
Anexo 55. Prueba de corte de la fermentación del grupo genético del CATIE: Marañón, repetición 2.....	89
Anexo 56. Prueba de corte de la fermentación del grupo genético del CATIE: Marañón, repetición 3.....	89
Anexo 57. Prueba de corte de la fermentación del grupo genético del CATIE: Nacional, repetición 1.....	89
Anexo 58. Prueba de corte de la fermentación del grupo genético del CATIE: Nacional, repetición 2.....	90
Anexo 59. Prueba de corte de la fermentación del grupo genético del CATIE: Nanay, repetición 1.....	90
Anexo 60. Prueba de corte de la fermentación del grupo genético del CATIE: Nanay, repetición 2.....	90
Anexo 61. Prueba de corte de la fermentación del grupo genético del CATIE: Nanay, repetición 3.....	91
Anexo 62. Prueba de corte de la fermentación de clones CATIE Guatuso: repetición 1.....	91
Anexo 63. Prueba de corte de la fermentación de clones CATIE Guatuso: repetición 2.....	91
Anexo 64. Prueba de corte de la fermentación de clones CATIE Guatuso: repetición 3.....	92
Anexo 65. Prueba de corte de la fermentación de clones CATIE Upala: repetición 1.....	92
Anexo 66. Prueba de corte de la fermentación de clones CATIE Upala: repetición 2.....	92
Anexo 67. Prueba de corte de la fermentación de clones CATIE Upala: repetición 3.....	93
Anexo 68. Prueba de corte de la fermentación de Híbridos Guatuso: repetición 1.....	93
Anexo 69. Prueba de corte de la fermentación de Híbridos Guatuso: repetición 2.....	93
Anexo 70. Prueba de corte de la fermentación de Híbridos Guatuso: repetición 3.....	94
Anexo 71. Prueba de corte de la fermentación de Híbridos Pavas Upala: repetición 1.....	94
Anexo 72. Prueba de corte de la fermentación de Híbridos Pavas Upala: repetición 2.....	94
Anexo 73. Prueba de corte de la fermentación de Híbridos Pavas Upala: repetición 3.....	95

Anexo 74. Prueba de corte de la fermentación de Híbridos Cuatro Bocas Upala: repetición 1....95
Anexo 75. Prueba de corte de la fermentación de Híbridos Cuatro Bocas Upala: repetición 2....95
Anexo 76. Prueba de corte de la fermentación de Híbridos Cuatro Bocas Upala: repetición 3....96

1. INTRODUCCIÓN

El cacao (*Theobroma cacao* L.) por más de 3 000 años ha estado ligado a las comunidades indígenas mestizas del trópico de América. Este árbol, nativo de la zona alta del río Amazonas en América del Sur, fue domesticado y cultivado por las etnias mayas de México y América Central. La producción actual de cacao en América Central representa menos del 0.1% de la producción mundial. Sin embargo, es de gran importancia económica para más de 15 000 familias centroamericanas que viven en zonas remotas y de difícil acceso en esta región (Somarriba *et al.*, 2010).

La especie *T. cacao* L. (Malvaceae) comprende un gran número de variedades, caracterizadas por una enorme diversidad genética (Bartley, 2005). Sin embargo, se acepta que la mayor parte del cacao comercial, incluye tres complejos genéticos: Criollo, Forastero/Amazónico y Trinitario (Cuatrecasas, 1964; N'Goran, Laurent, Risterucci, & Lanaud, 1994). No obstante, a través del tiempo y por generaciones, las plantaciones de cacao han estado sometidas a la influencia de factores evolutivos generando un amplio espectro de genotipos (García, 2008). De modo que, estudios realizados por Motamayor *et al.*, (2008) proponen una nueva clasificación del germoplasma de cacao, ya no en tres grupos genéticos, sino en 10 grupos principales: Marañón, Curaray, Criollo, Iquitos, Nanay, Contamana, Amelonado, Purús, Nacional y Guayana.

Aspectos como la genética, condiciones ambientales de crecimiento del cacao, así como la fermentación son factores que afectan la calidad y composición bioquímica del cacao (Kongor *et al.*, 2016; Niemenak, Rohsius, Elwers, Omokolo Ndoumou, & Lieberei, 2006). Estudios realizados por Navia & Pazmiño (2012) establecen la importancia de las prácticas post cosecha en la calidad del cacao; siendo la fermentación una operación indispensable. En esta etapa la pulpa (que envuelve las semillas) es metabolizada por microorganismos que producen cambios bioquímicos, dando origen a precursores de aroma y sabor del cacao (Contreras, Bertorelli, Fariñas, & Parra., 2002).

Entre esos cambios bioquímicos destaca la oxidación de polifenoles, específicamente la disminución de la (-) epicatequina y la (+) catequina, visible a través del desarrollo de la pigmentación marrón (Cros & Jeanjean, 1995). Además se fomentan cambios en los contenidos de precursores sensoriales tales como fenólicos (Luna, Crouzillat, Cirou, & Bucheli, 2002), alcaloides (cafeína y teobromina) (Bucheli, Rousseau, Alvarez, Laloi, & McCarthY, 2001), acidez

volátil (en especial el ácido acético) (Cros & Jeanjean, 1995), y ésteres, todos indicadores de la calidad organoléptica del cacao.

Algunos estudios confirman el efecto de la fermentación en la calidad sensorial del cacao asociada a un aumento en el contenido de péptidos, aminoácidos libres y azúcares reductores, precursores del sabor del chocolate; así como de los ácidos orgánicos responsables de las notas de sabor ácidas del cacao (Afoakwa, Paterson, Fowler, & Ryan, 2008; R. Schwan & Wheals, 2004a). En confirmación de lo anterior Rohsius & Matissek (2006) establecen que el contenido de aminoácidos libres, azúcares reductores, compuestos fenólicos y ácidos orgánicos son excelentes descriptores de calidad del cacao en bruto.

Asimismo, estudios hacen énfasis en el análisis de azúcares y metabolitos tales como ácidos orgánicos y alcoholes en pulpa, así como otros precursores de sabor desarrollados dentro del grano debido a la acción de microorganismos en la pulpa. El monitoreo de las transformaciones bioquímicas de dichos compuestos son de gran importancia en el desarrollo de cacaos aptos para la industria chocolatera. Los azúcares y los polisacáridos de la pulpa de cacao son fermentados por microorganismos, produciendo metabolitos y condiciones que causan la muerte del embrión e iniciando una serie de reacciones bioquímicas dentro del grano que generan precursores de sabor a chocolate (Afoakwa *et al.*, 2008; Lima, Almeida, Rob Nout, & Zwietering, 2011; R. Schwan & Wheals, 2004a).

Según Oberthür *et al.*, (2011), los mercados internacionales señalan cada vez más la demanda de productos diferenciados. Este nuevo consumidor valora en particular la apreciación de aspectos no tangibles tales como el origen geográfico y las condiciones ecológicas y sociales vinculadas a la producción. Adicionalmente, destaca la valorización de notas sensoriales especiales, que podrían estar asociadas a la interacción de aspectos genéticos (variedades) y bioquímicos (descriptores). Por lo tanto, resulta clave el desarrollo de metodología de micro fermentación en reconocimiento del potencial de calidad de variedades particulares.

No obstante, la fermentación es un proceso difícil de controlar, en particular con respecto a la homogeneidad (formación de gradiente), factores físicos (por ejemplo: temperatura, pH, oxígeno disuelto) y químicos (como disponibilidad de nutrientes) (De Vuyst & Weckx, 2010). Además, la fermentación de cacao en pilas o cajas generalmente requiere al menos 150 kg de

granos frescos y húmedos para alcanzar la temperatura de fermentación apropiada. Esto incurre en altos gastos de envío para obtener cantidades suficientes de cacao para experimentos de fermentación (Böle Biehl, Passern, & Sagemann, 1982). Tales anuncios justifican la necesidad de nuevos diseños de fermentadores, tener algunos de estos parámetros de proceso bajo control, al menos entre ciertos límites, y acelerar y controlar con precisión el proceso de fermentación en masa de cacao.

De esta forma, el propósito de la presente investigación fue analizar las transformaciones bioquímicas asociadas a la calidad de diferentes grupos genéticos del cacao (*T. cacao* L.) mediante un proceso de micro fermentación controlada. Dicho método proporcionará información útil para contribuir con la identificación de cualidades deseables en procesos de mejoramiento genético. Además, contribuirá como una fundamentación científica en el diseño de una estrategia para la optimización de procesos de transformación del cacao, hacia la diferenciación de la calidad, mediante la producción de perfiles sensoriales específicos.

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo general

Analizar las transformaciones bioquímicas asociadas a la calidad de algunos grupos genéticos del cacao (*T. cacao* L.) mediante un sistema de micro fermentación controlada, como base para el desarrollo de metodología necesaria en la identificación de cualidades deseables en procesos de mejoramiento genético.

1.1.2 Objetivos específicos

Establecer un sistema experimental de micro fermentación controlada mediante el uso de un inóculo estándar para el análisis comparativo de indicadores bioquímicos asociados a la calidad en diferentes grupos genéticos del cacao.

Estudiar indicadores bioquímicos asociados a la calidad, en pulpa (azúcares reductores, etanol, ácido láctico y acético) y granos (epicatequina, teobromina y cafeína) mediante cromatografía líquida (HPLC), detección de índice de refracción y arreglo de diodos, a lo largo del proceso fermentativo.

2. MARCO TEÓRICO

2.1 Origen del cacao

Cuatrecasas citado por Quiroz (2002) confirma la teoría que el centro de origen del cacao se sitúa en la cuenca del Amazonas. Además, propone la existencia de subespecies que corresponden a los Criollos y Forasteros; siendo la primera subespecie originaria de América Central y la segunda del bajo de la Amazonas, evolucionando independientemente.

Como bien se sabe, tres grupos genéticos de cacao han sido descritos y cultivados tradicionalmente alrededor del mundo: Criollo, Forastero (también llamado Amelonado) y Trinitario (Powis, Cyphers, Gaikwad, Grivetti, & Cheong, 2011). Con respecto al Trinitario, estudios confirman la naturaleza híbrida del tipo o grupo Trinitario como el cruce de Criollo con Forastero (N'Goran *et al.*, 1994).

2.2 Mercados y valorización de calidades diferenciadas

Según cifras de la Organización Internacional de Cacao (IICO), África concentra el 70.3% de la producción mundial de esta materia prima. Las otras regiones productoras son América Latina (15.4%) y Asia-Oceanía (14.3%). Costa de Marfil, el número uno a nivel mundial, es fuente del 35.6% del cacao en grano con una producción de 1.41 millones de toneladas en 2011/2012, por delante de Ghana (21.7%) e Indonesia (12.1%). Mientras que en América Latina, Brasil (5.2%) ocupa el quinto lugar y Ecuador (4.8%) el séptimo (International Cocoa Organization (IICO), 2012).

La importancia del cacao radica en sus frutos de los cuales se extraen de 30 a 50 semillas por mazorca. Estas son utilizadas ampliamente en la industria alimentaria, farmacéutica y cosmética; quienes demandan manteca de cacao (grasas) y torta de cacao o cocoa (obtenido al extraer las grasas), o bien licor de cacao (pasta de cacao) para la elaboración de chocolates. Esta industria genera divisas por unos 73 000 millones de dólares (Ploetz, 2007), y de ella dependen unos 60 000 empleos en todo el mundo (Lanaud *et al.*, 2009).

Asimismo, las semillas de cacao, se consideran estimulantes debido a la presencia de metilxantinas (alcaloides purínicos) como la teobromina y la cafeína. El chocolate, extraído de los granos procesados, tiene un alto valor nutritivo y alimentario, especialmente debido a su alta

concentración de carbohidratos, lípidos, proteínas y más de 300 compuestos químicos (Doran & Parkin, 1994).

En el mercado mundial se distinguen, de manera general, dos grandes categorías de granos de cacao: los granos de cacao ordinario (“basic beans” en Estados Unidos o “bulk beans” en Europa), utilizados en la fabricación de manteca de cacao y de productos con gran cantidad de chocolate, y los granos de cacao fino o de aroma (“flavor beans” en Estados Unidos), que dan características específicas de aroma o color en chocolates finos y revestimientos o capas de cobertura (CCI, 1991).

El mercado gourmet paga sobrepagos por almendras obtenidas del genotipo Criollo y destina el grano a la elaboración de chocolates “finos” altamente cotizados en Estados Unidos y Europa. Esta situación, sumada a otras características de mercadeo, que premia los productos con denominación de origen y simplifica los requerimientos de comercio, estimula la conservación, cultivo y comercialización de genotipos con calidad “superior”(Vázquez, Molina, Núñez, & Salvador, 2012).

2.3 Diversidad genética

La diversidad genética del cacao juega un rol muy importante en: la conservación del germoplasma nativo y mejorado; utilización de germoplasma promisorio con fines de propagación clonal; fuente de genes para los programas de mejora genética; mejor comprensión de las relaciones taxonómicas entre variedades; y elaboración de mapas genéticos (García, 2008). De modo que, tal diversidad genética proporciona seguridad contra cualquier amenaza presente o futura al cultivo y contribuye con la sostenibilidad de la economía mundial del cacao (Aikpokpodion, 2010).

Los recursos genéticos de cacao se conservan en bancos de germoplasma tales como: colecciones base (CATIE-Costa Rica y CRU Trinidad y Tobago), y colecciones activas (como el Banco de germoplasma de cacao-UNAS-Tingo María). Las colecciones base se caracterizan por poseer un elevado número y diversidad de accesiones, mientras que las colecciones activas presentan menor número y diversidad de accesiones (García, 2008).

2.3.1 Colecciones de germoplasma en el mundo

Hasta 1991 el “Internacional Cocoa Germplasm Database” (ICGD) ha registrado en su base de datos alrededor de 8 000 clones, incluyendo materiales silvestres y seleccionados por programas de mejoramiento genético. Actualmente, existen dos bancos genéticos internacionales calificados como “colecciones internacionales” por el Instituto Internacional para los Recursos Fitogenéticos (IPGRI); uno en Trinidad y Tobago (The International Cocoa Genebank at Trinidad (ICG, T)) y el otro en Costa Rica, CATIE (The International Cacao Collection at CATIE (IC3)) (Martinez, 2007).

El banco de germoplasma del CATIE (Costa Rica), conserva más de 1 200 accesiones (principalmente Trinitarios y Criollos). El banco de germoplasma de la Unidad de Investigación de Cacao (CRU) de la Universidad de las Indias Occidentales (Trinidad y Tobago), conserva más de 2 500 accesiones de cacao, principalmente Forasteros del Alto Amazonas, Trinitarios y Criollos (Eskes & Lanaud, 2001).

En otros continentes también existen importantes colecciones de germoplasma de cacao como: Ghana, Nigeria, Camerún y Costa de Marfil (África); Malasia, Indonesia y Papúa Nueva Guinea (Asia-Pacífico). El Centro de Cooperación Internacional en Investigación Agronómica para el Desarrollo (CIRAD) en la Guyana Francesa conservan más de 200 árboles madres silvestres (Eskes & Lanaud, 2001). Además existen centros de cuarentena intermedia en la Universidad de Reading (Inglaterra) y en Miami (USA) (García, 2008).

2.3.2 Grupos genéticos de cacao

2.3.2.1 Forastero

Forastero, nativo de la cuenca amazónica (Lima *et al.*, 2011), comprende el 85% de la producción mundial de cacao (Saltini, Akkerman, & Frosch, 2013). Se denomina en el comercio comúnmente "cacao en masa". Se caracterizan por sus frutos de cáscara dura y leñosa, de superficie relativamente tersa; y de granos pequeños, aplanados de color morado y sabor amargo. Dentro de este grupo se destacan distintas variedades como Cundeamor, Amelonado, Sambito, Calabacillo y Angolet (Centro de Comercio Internacional (CCI), 1991; Enríquez, 2004; Motamayor, 2001).

Se cultivan predominantemente en África Occidental, Costa de Marfil, Ghana, Nigeria y Camerún. Son muy productivos y considerados moderadamente resistentes a plagas y enfermedades (Bartley, 2005; Ferrão, 2002; Lima *et al.*, 2011).

Conclusiones de Ortiz de Bertorelli, Graziani de Fariñas, & Gervaise (2009) demostraron que los granos Forasteros tienen un pH más alto después de la fermentación y el secado, en comparación con los granos Criollos. Así, el chocolate producido es menos amargo, astringente y ácido que los chocolates producidos a partir de granos Criollos o Trinitarios (Clapperton *et al.*, 1994; de Muijnck, 2005; Sukha, Butler, Umaharan, & Boulton, 2008).

2.3.2.2 Criollo

Criollo es el cacao original indígena, cultivado al Norte, Sur y Centroamérica. Los granos son de color blanco a marfil o color púrpura muy pálido, debido a un gen inhibidor de antocianina (Ferrão, 2002). Es clasificado como subespecie, del cual se obtiene el cacao “fino”, que contribuye a la producción mundial con el 5% (Afoakwa *et al.*, 2008). Se caracterizan por sus frutos de cáscara suave y semillas redondas medianas a grandes, poseen sabores dulces y agradables, cuyos árboles son de porte bajo y menos robustos con relación a otras variedades (CCI, 1991; Enríquez, 2004; Soria, 1966).

Sus bajos rendimientos y susceptibilidad a muchas enfermedades hacen difícil cultivar. Por lo que, su cultivo es limitado a Centroamérica, y en unas pocas regiones de Asia (Ferrão, 2002; Thompson, Miller, & Lopez, 2007a). Aunque se informa que el cacao Criollo contienen una gran cantidad de pirazinas (Reineccius, Keeney, & Weissberger, 1972) y presenta pH bajo que afecta fácilmente el perfil del sabor (Ortiz de Bertorelli *et al.*, 2009). Estudios por Kongor *et al.*, (2016) confirman que su consumo se encuentra en expansión y es mucho más exigente respecto a la calidad de la materia prima y de los productos derivados.

2.3.2.3 Trinitario

Según Motamayor (2001) los cacaos Trinitarios están conformados por híbridos que comprenden las mezclas entre el Criollo y el Forastero tipo Amelonado. Aparentemente, se mezclaron en el Caribe, siendo los genotipos típicos de Granada, Jamaica, Trinidad y Tobago. Se cree que este grupo se originó cuando un genotipo Criollo se cruzó naturalmente con un genotipo

Amelonado de Brasil. Por esta razón, estos materiales presentan características morfológicas y genéticas de ambas razas (CCI, 1991; Soria, 1966).

Ocupan del 10 al 15% de la producción mundial. Presentan granos de tamaño mediano a grande y cotiledones de color castaño (CCI 1991; Soria, 1966). Cuyos granos son variables en color (rara vez blanco), y los árboles muestran susceptibilidad plagas y enfermedades intermedias a las poblaciones de Forastero y Criollo (Bartley, 2005; Ferrão, 2002; Fowler, 1999).

El cultivar Trinitario es conocido en el mercado por tener fuertes caracteres básicos de chocolate y algún tipo de aroma que no se encuentran en otras variedades (Afoakwa *et al.*, 2008). Se utilizan para hacer chocolate negro de alta calidad (Fowler, 1999). Además, las variedades Trinitario y Criollo producen los cacao "finos" cuya participación en la producción mundial total de cacao es inferior al 5% (International Cocoa Organization (IICO), 2015).

2.3.3 Clasificación por nuevas técnicas genómicas

Como se mencionó Motamayor *et al.*, (2008) propone una nueva clasificación del germoplasma, mediante el uso de 1 241 genotipos que cubren un gran muestreo geográfico con 106 marcadores de micro satélites. Esta clasificación, mantiene los términos utilizados para identificar los cultivares tradicionales Amelonado (Forastero), Criollo y Trinitario, y separa a las poblaciones altamente diferenciadas dentro de lo que previamente se había clasificado como el grupo genético Forastero, en 10 grupos: Marañón, Curaray, Criollo, Iquitos, Nanay, Contamana, Amelonado, Purús, Nacional y Guiana (Anexo 1); en reemplazo de los 3 grupos que se conocían.

2.4. Perfil químico del cacao

La composición química de los granos de cacao ha sido ampliamente estudiada (Afoakwa, 2010; Bertazzo, Comai, Brunato, Zancato, & Costa, 2011; B. Biehl & Ziegleder, 2003; Thompson, Miller, & Lopez, 2001). El grano de cacao fresco tiene una composición aproximada de 32-39% de agua, 30-32% de grasa, 10-15% de proteínas, 5-6% de polifenoles, 4-6% de almidón, 4-6% de pentosanos, 2-3% de celulosa, 2-3% de azúcares, 1-2% de teobromina, 1% de ácidos y 1% de cafeína (Bertazzo *et al.*, 2011). Los azúcares predominantes en los granos de cacao son sacarosa, fructosa y glucosa (Afoakwa, 2010), siendo la sacarosa el componente principal (aproximadamente el 90% de los azúcares totales), seguida de fructosa y glucosa (aproximadamente 6%) (B. Biehl & Ziegleder, 2003).

En el cacao se distinguen tres grupos principales de polifenoles: catequinas, antocianinas y procianidinas, cuya característica común es una estructura de tipo flavonoide (Wollgast & Anklam, 2000). La principal catequina en el grano de cacao es (-) - epicatequina con hasta un 35% del contenido de polifenoles. Otras catequinas encontradas en cantidades más pequeñas son (+) - catequina, así como rastros de (+) - galocatequina y (-) - epigalocatequina (Afoakwa, 2010; Wollgast & Anklam, 2000).

Además, algunos estudios epidemiológicos han establecido una correlación inversa en la aparición en la prevención de enfermedades crónicas e ingesta de flavonoides. Enfermedades como cardiovasculares y cerebrovasculares, el cáncer y otros trastornos como la diabetes y la artritis reumatoide (Othman, Ismail, Ghani, & Adenan, 2007; Wollgast & Anklam, 2000).

Los granos de cacao no solo son ricos en polifenoles, sino que también son ricos en metilxantinas, que representan alrededor del 3.2% de la composición de chocolate no endulzado (Belscak, Komes, Horzic, Ganic, & Karlovic, 2009). Las principales metilxantinas del cacao son la teobromina (3.7% sin grasa) y la cafeína (alrededor del 0.2%) y se han asociado con algunos efectos fisiológicos en diversos sistemas corporales, incluidos los sistemas nervioso central, gastrointestinal, respiratorio y renal (Li *et al.*, 2012).

2.4.1 Calidad del cacao

La calidad en el cacao, como en todo producto o materia prima, está dada por un número amplio de atributos o características. Muchos de ellos intrínsecos a la genética vegetal y otros, atribuibles a las condiciones ambientales donde se desarrolla, así como a las prácticas pre y pos cosecha (Vázquez *et al.*, 2012).

Para tratar de homogenizar la terminología y atributos entendibles como “calidad” se ha acordado mediante estándares internacionales, establecer que el cacao de buena calidad comercial debe ser: a) fermentado, completamente seco, libre de granos huecos, libre de olores anormales o extraños y libre de cualquier evidencia de adulteración; b) de tamaño bastante uniforme, considerablemente libre de granos fragmentados, fragmentos y piezas de cáscara, y prácticamente exentos de materias extrañas (Dongo, Aigbekaen, Jayeola, Emaku, & Orisajo, 2009).

La evaluación sensorial en el cacao resulta ser un instrumento metodológico importante para poder apreciar los atributos y defectos heredados de los cruces entre clones de alta calidad. Además, permite evaluar los efectos generados por el procesamiento primario y pos cosecha sobre su calidad (Clapperton, 1992; Clapperton *et al.*, 1994; Lockwood & Eskes, 1995; Sukha *et al.*, 2008).

2.5 Factores que influyen en la calidad del cacao

De acuerdo con Kongor *et al.*, (2016) la composición compleja del sabor del cacao depende del genotipo del grano, el tipo de suelo y la edad del cacao, de los tratamientos post cosecha como el pre condicionamiento de la pulpa, la fermentación y el secado, así como los procesos industriales como el tueste, almacenamiento, y transporte (Afoakwa, 2010; Afoakwa *et al.*, 2008). Por ello, cada tipo de cacao tiene un carácter de sabor potencial único (Afoakwa *et al.*, 2008).

2.5.1 Importancia de la genética en la calidad del grano de cacao

Las diferencias en el sabor, se pueden atribuir a la composición genética inherente del grano, origen botánico. Así como, las condiciones de crecimiento tales como el clima, la cantidad de sol y lluvia, condiciones del suelo, maduración, tiempo de cosecha, y el tiempo entre la cosecha y la fermentación del grano contribuyen a las variaciones en la formación final del sabor (Kongor *et al.*, 2016).

Además, de acuerdo con el genotipo de cacao influye el tipo y cantidad de proteínas, carbohidratos y polifenoles almacenados en el grano (Afoakwa *et al.*, 2008). Esto determina las cantidades y el tipo de precursores formados durante los procesos de fermentación y secado que conducen a la formación de sabor, influye así tanto en el tipo de sabor de los granos como en la intensidad (Taylor, 2002; Taylor & Roberts, 2004).

2.5.2 Fermentación del cacao

En el procesamiento del cacao existen dos etapas críticas, que son: la fermentación y el secado. Estos procesos ocasionan que las paredes celulares se destruyan, permitiendo que los contenidos de la semilla estén expuestos a otros constituyentes químicos que afectan sus propiedades organolépticas. El aroma del cacao es una condición innata, los tratamientos pos cosecha, incluido el secado, son los factores determinantes de la expresión de ese potencial aromático y sensorial (Fito, Lemaguer, & Betoret, 2007; Perea, Ramírez, & Villamizar, 2010)

La fermentación del cacao involucra la degradación microbiana de la pulpa y complejas reacciones enzimáticas dentro de los cotiledones, similares a la germinación. Primero, los azúcares simples son metabolizados por levaduras y bacterias lácticas bajo condiciones anaeróbicas, para producir etanol y ácido láctico respectivamente (Forsyth & Quesnel, 1963). Por otra parte, el consorcio de levaduras consume el oxígeno, creando un ambiente anaerobio que favorece el desarrollo de bacterias lácticas.

Luego, el alcohol es transformando en ácido acético por bacterias aeróbicas, con abundante desprendimiento de calor, lo cual eleva la temperatura en la masa fermentante (Jinap, 1994). El embrión muere bajo la acción conjunta de la penetración de los ácidos orgánicos, reducción de la concentración de oxígeno y la alta temperatura ($\leq 50^{\circ}\text{C}$). Los ácidos, principalmente el acético, reducen el pH del cotiledón y provocan la ruptura de sus membranas celulares permitiendo el contacto entre sustancias almacenadas (proteínas, carbohidratos, polifenoles, triglicéridos etc.) y enzimas endógenas (B. Biehl, Brunner, Passern, Quesnel, & Adomako, 1985).

De acuerdo con la cantidad de ácidos absorbidos, los triglicéridos asumen formas de agregación particulares (compacta o dispersa) que restringen tanto la extensión de las reacciones enzimáticas como la exudación de los productos resultantes, muchos de los cuales son precursores aromáticos tales como: aminoácidos, péptidos, azúcares, etc. (B. Biehl *et al.*, 1993).

Sanin y Gutiérrez (1990) citado por Mejía & Arguello (2000) proponen que la duración de la fermentación es uno de los aspectos más importantes de esta fase, que depende del tipo de cacao, método de fermentación, frecuencia de aeración, volumen de cacao a fermentar, estado de madurez de las mazorcas y condiciones sanitarias del grano. Si la fermentación se prolonga excesivamente, la masa de cacao se contamina por microorganismos proteolíticos, provocando la neutralización de ácidos existentes por el amoníaco, causando la pérdida del sabor a chocolate con desarrollo de otros aromas y sabores extraños.

Moreno & Sánchez (1989) manifiestan que la fermentación ha concluido cuando los granos se ven hinchados se reduce la humedad, desciende la temperatura y al partir los granos presentan cambios de color interno y grietas en los cotiledones.

Después del proceso de beneficio, los granos de cacao contienen esencialmente manteca de cacao (48-57%), compuestos fenólicos (8-20%), proteínas (9%), agua (5-7%), teobromina (1.3-2.0%), cafeína (0.1-0.7%). Además, aminoácidos libres (0.8%), almidón (4.5-7.0%), pectinas (4.1%), celulosa (9%), ácidos orgánicos (0.05-0.50% por cada ácido), minerales (2.6 a 4.2%),

azúcares: glucosa (0.1%) y fructosa (0.4-0.6%) (Álvarez, 2008; Amores *et al.*, 2007). En resumen, los granos de cacao fermentados contienen fundamentalmente manteca de cacao, compuestos fenólicos y proteínas.

Estudios realizados mostraron que el contenido de grasa no es afectado significativamente durante la fermentación, y el contenido promedio de grasa en granos fermentados y secos de 6 clones de cacao nacional fue de $48.8\% \pm 3.21\%$ (Álvarez, 2008; Amores *et al.*, 2007; Espín, 2006). No obstante, Schwan & Wheals (2004b) mencionan que durante la fermentación la acción de una amplia gama de levaduras, y bacterias ácido lácticas y ácido acéticas desencadenan una serie de productos microbianos, como etanol, ácido láctico y ácido acético, que matan el embrión y causan la producción de precursores de sabor.

El cacao es extraordinariamente rico en polifenoles, estos compuestos son almacenados en las células pigmentarias del cotiledón, y según la cantidad de antocianinas presentes en estas células los granos de cacao son de color blanco a violeta. Durante la fermentación los polifenoles disminuyen su concentración por efectos de difusión en los lixiviados de la fermentación, por oxidación y polimerización de los compuestos fenólicos con las proteínas. Este fenómeno es de gran importancia puesto que los polifenoles son los responsables del gusto astringente y amargo, por tanto, influyen directamente sobre la calidad final del grano usado fundamentalmente para la elaboración de chocolates. Trabajos de investigación realizados en diferentes proyectos del INIAP con muestras de cacao Nacional muestran que el contenido de polifenoles en las almendras disminuye en un rango del 44-51% durante la fermentación (Amores *et al.*, 2007; Espín, 2006; Samaniego, 2012).

La teobromina y la cafeína pertenecen a la familia de las purinas y representan más del 99% de los alcaloides presentes en el cacao. Estos compuestos sufren una disminución de su concentración en el transcurso de la fermentación equivalente al 20-25%. Investigaciones realizadas describen a la relación teobromina/cafeína como un parámetro con el cual se puede discriminar el cacao por su origen, encontrándose valores que van desde 2.2 a 6.9 para genotipos de cacao producidos en el Ecuador (Espín, 2006).

En resumen, durante la fermentación habrá un aumento dentro del grano de los contenidos en azúcares reductores y aminoácidos libres hidrófobos, precursores del aroma térmico. Así como, una disminución de las purinas y compuestos fenólicos que ayudan a que el cacao sea menos amargo y astringente.

2.5.3 Indicadores bioquímicos asociados a la calidad sensorial en la fermentación

De acuerdo con Voigt *et al.*, (1994) dentro de los componentes importantes de sabor producidos durante la fermentación, incluyen: etil-2-metilbutanoato, tetrametilpirazina y ciertas pirazinas. Las notas amargas son evocadas por la teobromina y la cafeína, junto con ditopiperizinas formadas a partir del tostado a través de descomposiciones térmicas de proteínas. Otros compuestos precursores del sabor derivados de los aminoácidos liberados durante las fermentaciones incluyen: 3-metilbutanol, fenilacetaldehído, 2-metil-3- (metil dithio) furano, 2-etil-3,5-dimetil- y 2,3-dietil-5-metilpirazina.

Asimismo estudios por Jinap (1994) establecen que durante la fermentación, ácidos volátiles como acético, propiónico, butírico, isobutírico e isovalérico, además de ácidos no volátiles tales como oxálico, cítrico, málico, succínico, láctico y tartárico, se desarrollan principalmente a través de diversas acciones de microorganismos en la pulpa y luego se difunden en el grano (cotiledón) durante la misma. La acumulación de dichos ácidos durante la fermentación proporciona un ambiente ácido para la muerte del embrión y reacciones enzimáticas que conducen al desarrollo de precursores del sabor, cuyos ácidos residuales determinan el sabor ácido del producto final.

El tiempo de fermentación es crucial para la formación de compuestos de sabor y precursores de sabor. Aculey *et al.*, (2010) notaron un aumento en el nivel de ácidos orgánicos tales como ácido propanoico, ácido 2- metilpropanoico, ácido 3-metilbutanoico y ácido acético después de 72 h de fermentación de cacao. Los mayores niveles de ácidos orgánicos son el resultado de la descomposición de los azúcares de la pulpa que rodea los granos de cacao (Bonvehí, 2005). El ácido propanoico, el ácido 2-metilpropanoico, el ácido 3-metilbutanoico y el ácido acético son importantes compuestos de olor activo en el cacao (Bonvehí, 2005; Frauendorfer & Schieberle, 2006).

3. METODOLOGÍA

3.1 Ubicación del estudio

3.1.1 Fase de campo

La cosecha de las mazorcas de los grupos genéticos analizados se realizó en el Jardín Clonal Madre del Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza (CATIE), ubicado en el Cantón de Turrialba, provincia de Cartago, Costa Rica, a 602 m.s.n.m., 9°38' de latitud norte y 83°38' de longitud oeste (Astorga, 1999).

También se analizaron varios genotipos de cacao que representan los cacaos tipo comerciales, los cuales, son los cacaos costarricenses que se venden a mercados internacionales y nacionales para la producción de chocolate o productos derivados. Estos cacaos se tomaron de diferentes localidades del país tales como Guatuso, Upala, Pavas de Upala y Cuatro Bocas de Upala. Se trabajaron con clones CATIE (paquete tecnológico compuesto por seis clones de cacao (CATIE-R1, CATIE-R4, CATIE-R6, CC-187, ICS-95 T1 y PMCT-58), caracterizados por su excelente calidad, alta producción y tolerancia a la *Monilia (Moniliophthora roreri)*), e híbridos (cuya ascendencia genética se desconoce). Por lo tanto, se trabajó con Clones CATIE de Guatuso, Clones CATIE de Upala, Híbridos de Pavas Upala, Híbridos de Cuatro Bocas de Upala e Híbridos de Guatuso.

3.1.2 Fase de laboratorio

El quiebre de las mazorcas, extracción de las semillas en baba, la fermentación y los análisis químicos se realizaron en el Laboratorio de Calidad e Innovación Agroalimentaria (Lab-CIAGRO). Ubicado dentro la Escuela Ciencias Agrarias de la Universidad Nacional de Costa Rica, Campus Omar Dengo cuyas coordenadas son 9°59'56"N 84°06'41"O, situada en la provincia de Heredia.

3.2. Selección de muestra en campo

El Jardín Clonal Madre del CATIE presenta una cantidad de 1 212 accesiones, de las cuales solo 194 accesiones están clasificadas de acuerdo al grupo genético. Por lo tanto, en este estudio se tomaron en cuenta sólo aquellas accesiones que estaban debidamente clasificadas de acuerdo a la nueva clasificación basada en 10 grupos genéticos de cacao según Motamayor *et al.*, (2008). En la siguiente tabla se detalla la cantidad de accesiones utilizadas en este estudio por grupo genéticos y sus debidas repeticiones.

Tabla 1. Accesiones analizadas por grupo genético provenientes del Jardín Clonal del CATIE, Turrialba.

Grupo genético	Repetición	Accesión	Cantidad de mazorcas utilizadas	Subtotal
Iquitos	R1	IMC- 27	4	10
		IMC-20	4	
		NA-34	2	
	R2	IMC-71	1	11
		IMC-16	2	
		IMC-107	1	
		IMC-54	1	
		IMC-47	4	
		IMC-57	1	
		IMC-45	1	
Marañón	R1	PAG-67	7	10
		PAG-188	3	
	R2	PA-150	2	7
		PA-19	5	
	R3	PA-44	3	9
		PA-13	3	
		PA-120	1	
		PA-56	1	
		PA-16	1	
	Nacional	R1	EET-53	3
EET-58			3	
R2		UF-713	2	5
		UF-705	1	
		UF-273	2	
Nanay		R1	Pound - 7/B	8
	NA-756		2	
	R2	Pound- 12/A	4	9
		Pound- 16/A	1	
		Pound- 16/B	3	
		P-20	1	
		NA-804	3	
	R3	P-7p	4	12
		NA-387	5	

De cada grupo genético se seleccionó una muestra a conveniencia de al menos dos accesiones sanas (libres de lesiones de insectos y síntomas de enfermedad), más productivas (con mayor cantidad de mazorcas maduras, aquellas que presentan un sonido hueco o por la sensación de agitación). Las repeticiones representan accesiones diferentes (diferentes variedades), con el fin de adquirir la mejor representatividad por grupo genético. Se tomaron la cantidad necesaria de mazorcas hasta alcanzar un total de 1 kg de cacao en baba por repetición, para de llevar a cabo la fermentación.

En el caso de los cacaos comerciales provenientes de diferentes localidades del cantón de Upala y Guatuso. Las muestras de mazorcas denominadas “clones CATIE” están conformadas por la selección al azar de una mezcla proporcional de dos mazorcas por cada uno de los seis clones: CATIE-R1, CATIE-R4, CATIE-R6, CC-187, ICS-95 T1 y PMCT-58. Asimismo, con las muestras denominadas “híbridos”, al ser híbridos las muestras están constituidas por la selección al azar de una mazorca por árbol diferente, cuyas repeticiones están constituidas por 10 mazorcas provenientes de árboles diferentes.

3.3 Fermentación del cacao

3.3.1 Procedimiento del establecimiento del sistema de fermentación controlada

3.3.2.1 Aislamiento de microorganismos

El aislamiento de microorganismos se realizó basado en la metodología propuesta por Pereira *et al.*, (2012) con ciertas modificaciones propias. Se tomaron 25 g de baba de cacao (con 24 y 72 horas de fermentación de la finca de Elena Gaitán), se le añadieron 225 ml de solución salina (0.1% peptona bacteriológica, y 0.8% de NaCl), y se colocó en el agitador por al menos media hora a 25°C/300 rpm. Seguidamente se hicieron diluciones seriadas hasta llegar a la concentración máxima de 10^{-5} , se tomó 250 μ l de cada dilución (se usó el vórtex para mover la dilución) y se cultivó en un plato Petri con el medio correspondiente.

Las levaduras se inocularon en el medio agar YEPG (1% de extracto de levadura [Merck], 2% de peptona [Himedia], 2% de glucosa [Merck] [pH 5.6]) con 500 μ l de disolución de tetraciclina con agua estéril (2:1) para inhibir el crecimiento bacteriano. En el caso de las acetobacterias se inocularon en el medio YGM (2% glucosa, 2% manitol, 1% extracto de levadura, 1% ácido láctico, 0.5% peptona de soya neutralizada, 0.1% sulfato de magnesio 7 hidrato, 0.1% fosfato hidrogenado de mono potasio, 0.1% fosfato de di amonio y 0.1% de citrato de tri

sodio). Después de la dispersión, las placas de levadura se incubaron a 28°C por 2-3 días y las acetobacterias a 30°C durante 3-4 días.

Se debe recalcar que este trabajo no busca hacer un estudio de las levaduras como tal, sino minimizar la variabilidad en el sistema de fermentación por efecto de la variación en la composición microbiológica. Para esto, se aisló un grupo de microorganismos nativos y originadas en un sistema de fermentación espontánea, el cual se inoculó por igual en todos los lotes de micro fermentación correspondientes a cada genotipo considerado en este estudio.

3.3.1.2 Purificación de microorganismos

Se tomaron las concentraciones con las colonias más separadas entre sí (10^{-5}). Se identificaron por vista las colonias diferentes en forma y textura, de las cuales se seleccionó una colonia por microorganismo para aislar e inocular con un asa bacteriológica en sus respectivos medios de cultivos.



Figura 1. Colonias de las levaduras y bacteria de ácido acético aisladas.

3.3.2.3 Pruebas de tinción Gram

Se realizaron pruebas de tinción Gram para corroborar la naturaleza de los microorganismos deseados a inocular en este estudio (levadura y acetobacteria). En la cámara de flujo laminar, se tomó un beaker esterilizado y se le agregó 20 ml de agua destilada- esterilizada, con un asa bacteriológica se incorporó el inóculo hasta que el agua quedara un poco lechosa (un

poco turbia). Se colocó la suspensión del microorganismo con el asa bacteriológica en un portaobjetos y se secó pasando por el mechero (evitando que se queme).

Se aplicó gotas de violeta de genciana por un min y se escurrió para eliminar el exceso del reactivo. Seguidamente, se agregaron gotas de lugol por un min (para fijar la violeta de genciana), se lavó con alcohol etílico 95% (colocando el cubre objetos inclinado y aplicando alcohol), y se escurrió. Por último, se aplicó safranina por 30 segundos, se escurrió, lavó con agua, y se secó pasando por el fuego. Los microorganismos se observaron en el microscopio para determinar la tinción Gram de los mismos.

3.3.1.4 Identificación molecular de microorganismos

Aislados y purificados los microorganismos se procedió a tomar con un asa bacteriológica la cantidad máxima de microorganismos hallados en las placas petri. Se colocaron y almacenaron en tubos de microcentrífuga a -80°C hasta el momento del análisis molecular.

El ADN se extrajo usando el kit DNeasy Blood & Tissue de acuerdo con las indicaciones del protocolo (Manual QIAGEN 07/2006): Purification of Total DNA from Animal Tissues (Spin-Column Protocol). La calidad y cantidad del ADN extraído se verificó por medio de electroforesis en gel de agarosa al 0.8%.

La identificación molecular de la levadura se realizó de acuerdo con la metodología planteada por Fernández Maura *et al.*, (2016) usando los cebadores ITS5/ITS4 (White *et al.*, 1990) para la amplificación y secuenciación de la región espaciadora interna transcrita (ITS). También, se utilizaron los cebadores LR0R/LR6 y los cebadores LR0R/LR3 (Moncalvo, Lutzoni, Rehner, Johnson, & Vilgalys, 2000) para la amplificación del dominio D1/D2 de la subunidad grande del ADN ribosomal. Los ensayos de PCR se realizaron mediante las siguientes condiciones: desnaturalización inicial a 94°C durante 3 min; 35 ciclos de desnaturalización a 94°C durante 90 s, hibridación de imprimadores a 66°C (para ITS5/ ITS4) y 64°C (LR0R/LR6) durante 90 s, extensión a 72°C durante 2 min, seguido de un paso de extensión final a 72°C durante 10 min.

También se utilizaron los cebadores CA1, CA5R, CA21 y CA22R (Daniel & Meyer, 2003), ya que como menciona el mismo autor este gen muestra una resolución de especies más confiable en comparación con los genes ribosomales. Las condiciones de amplificación fueron:

desnaturalización inicial a 94°C durante 5 min; 40 ciclos de desnaturalización a 94°C durante 30 s, hibridación a 60°C durante 30 s, extensión a 72°C durante 1 min, seguido de una etapa de extensión final a 72°C durante 10 min.

La identificación molecular de la acetobacteria se realizó basada en la metodología propuesta por Thi, Ho, Zhao, & Fleet, (2014). Se amplificó el gen 16S del ADN ribosomal por medio de los cebadores 16Sd (5'-GCTGGCGGCATGCTTAAC ACAT-3 ') y 16Sr (5'-GGAGGTGATCCAGCCGCAGGT-3') (Guillermo, Ruiz, Poblet, & Mas, 2000). Las condiciones de amplificación fueron: desnaturalización inicial a 94°C durante 5 min; 40 ciclos de desnaturalización a 94°C durante 30 s, hibridación a 57°C durante 30 s, extensión a 72°C durante 1 min, seguido de una etapa de extensión final a 72°C durante 10 min.

Todos los productos de PCR se verificaron por medio de electroforesis en geles de agarosa al 1%, y fueron secuenciados por la empresa Macrogen (Seúl, Corea del Sur) utilizando los cebadores de amplificación mencionados. Las secuencias obtenidas se alinearon y editaron con el programa BioEdit 7.7 y se compararon con la base de datos del GenBank del NCBI (Centro Nacional de Información de Biotecnología, Bethesda, MD) por medio del algoritmo BLAST.

3.3.1.5 Conteo de Unidades Formadoras de Colonias (UFC)

De una placa petri con el microorganismo debidamente esporulado, se tomó con un asa bacteriológica y se incorporó en un beaker con un volumen conocido de agua destilada y estéril. Dicha dilución de esporas se agitó en vórtex durante 30 segundos e inmediatamente se tomó un alícuota con una pipeta pasteur o con gotero, y se depositó en la cámara de conteo Neubauer. Se determinó el número de esporas en los cuadros de cada esquina y en el cuadrante central del cuadro central principal (ver Fig. 2). Según la metodología establecida en French & Hebert, (1982), la concentración de esporas se calcula multiplicando el promedio del número de formadoras de colonias por el inverso de la dilución empleada para el conteo, por el inverso del factor de la cámara (10^6).

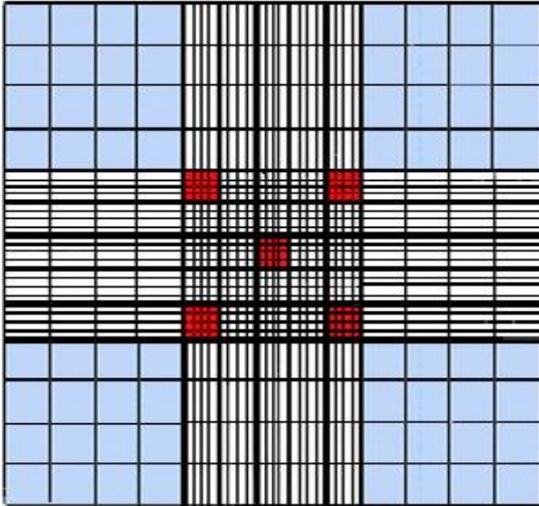
$$C = N * De * Fe$$

C= concentración inicial (unidades formadoras de colonias/ml)

N= número promedio de conidios por cuadrante

De= dilución empleada

Fe= factor de la cámara de Neubauer



■ Representan los cuadrantes en donde se contaron las unidades formadoras de colonias.

Figura 2. Cuadrantes utilizados en el conteo de Unidades Formadoras de Colonias (UFC).

Con el fin de garantizar condiciones iguales en cada fermentación, se utilizaron los microorganismos aislados, identificados anteriormente. Se inoculó la levadura a las cero horas y acetobacteria a las 48 horas.

3.3.1.6 Proceso de fermentación

El día 30 de octubre del 2018 se cosecharon las mazorcas de cada grupo genético provenientes del Jardín Clonal del CATIE, Turrialba. En el caso de las muestras comerciales provenientes de la zona de Upala, estas se cosecharon el día 19 de noviembre. Dichas mazorcas se trasladaron al Laboratorio CIAGRO para su debida fermentación.

Se procedió a lavar las mazorcas con agua, y se clasificaron de acuerdo a cada genotipo y repetición. Después de lavadas, se tomaron fotos respectivamente (ver anexos), y se cortaron cuidadosamente cerca de la base de pedúnculo, sin cortar las semillas. La extracción de las semillas en grano se realizó exceptuando la vena central (llamada placenta), después se colocaron y mezclaron en un recipiente, y se pesó 1 kg.

Se tomaron muestras de 20 g de granos de cacao en un tubo cónico de 50 ml (falcon) a las 0 horas de fermentación, para el análisis de azúcares y ácidos orgánicos en pulpa; y 10 granos en otro falcon para el análisis de epicatequina y metilxantinas en grano (ambos almacenados en congelación -20°C). Seguidamente se procede a efectuar la fase anaeróbica inicial (las primeras

48 horas) agregando y mezclando 100 ml de suspensión de la levadura *Hanseniaspora opuntiae* (10^6 UFC/ ml).

Posteriormente se colocaron en una malla y se colocaron en frascos de vidrios, de modo que la malla quede a unos centímetros de altura de la base del frasco para permitir el drenaje de los lixiviados. Los frascos no se cerraron, para facilitar la salida de CO_2 producto de la fermentación alcohólica (Fig. 3). Se incorporaron dentro de hieleras con agua para evitar la contaminación con insectos que podrían interrumpir el proceso de fermentación.



Figura 3. Demostración de la fermentación anaeróbica y mantenidas en hieleras para evitar la contaminación con insectos.

Transcurridas 48 horas se inició la fase aeróbica (48h a 144h). Se sacaron las mallas, se descartaron los lixiviados, y se colocaron en un recipiente para agregar y mezclar 100 ml de suspensión de *Acetobacter* spp. (10^6 UFC/ml), y se dejó reposar por 10 min. Se descartaron los lixiviados, se sacó el cacao de la malla, y se colocaron en beakers de 1000 ml y se procedió a incorporar los en la cámara incubadora a 32°C por 12 horas. Se programó el incremento de 4°C cada 12 horas, hasta llegar a una temperatura constante de 48°C , con el fin de simular la temperatura de las fermentaciones a escala comercial.

Cada 12 horas se monitoreó el pH de la pulpa, y consecutivamente se aireó la muestra (mezclando los granos en un recipiente e incorporando en el beaker, seguido a la incubadora). El pH de la pulpa en fermentación se determinó, mediante el potenciómetro Jenway modelo 3510, introduciendo el electrodo y termómetro en la parte media del beaker, tomando tres lecturas en

tres puntos diferentes (alrededor del beaker: lado izquierdo, derecho y centro). El pH-metro se calibró mediante el uso de tampones estándar de pH 4.005 y 7.000.

Cada 24 horas se tomaron muestras de 20 g de granos en un falcon para el análisis de azúcares y ácidos orgánicos en pulpa; y 10 granos en otro falcon para el análisis de fenólicos en grano, las cuales se almacenaron en el congelador -20°C hasta sus análisis respectivos. Todos los procedimientos se realizaron salvaguardando la óptima inocuidad, utilizando guantes, lavando y secando las herramientas por cada muestreo.



Figura 4. Las fermentaciones aeróbicas en beakers dentro de la incubadora (derecha) y toma de pH de la pulpa (izquierda).

Cumplidas las 144 horas, se retiraron los beakers de la incubadora y se procedió al secado de los granos por aproximadamente 4 días. Los granos se extendieron en bandejas, las cuales se dejaron un tiempo aproximado de 5 horas bajo sombra (para evitar el choque térmico). Después, se expusieron directamente al sol, moviendo los granos cada 2-3 horas para evitar que se tostaran. En las tardes cuando llovía o no había mucha radiación solar, se colocaron en un invernadero. Por último, se procedió a realizar las pruebas de corte, para lo cual se tomaron 10 granos por muestra de cacao, y se fotografiaron (anexos).

3.4 Análisis de compuestos químicos

3.4.1 Reactivos químicos

Los estándares químicos utilizados para comparar los tiempos de retención y las longitudes de onda con las muestras seleccionadas fueron: cafeína, (-) epicatequina, teobromina, glucosa, fructosa, ácido láctico, ácido acético y etanol. Todos ellos obtenidos de la marca Sigma-Aldrich con una pureza del 99%. A su vez, los reactivos, tales como: hexano (C₆H₁₄), metanol (MeOH), ácido acético (CH₃-COOH), fueron grado HPLC. Y el agua desionizada se obtuvo mediante el sistema Millipore Alpha Q.

3.4.2 Preparación de muestras

Las muestras de granos destinadas para el análisis de epicatequina y metilxantinas (teobromina, cafeína), fueron extraídas a partir de la metodología planteada por Hernández, Viera, María, Fernández, & Rodríguez, (2018). Los granos destinados para el análisis del compuesto fenólico (epicatequina) y las metilxantinas (teobromina, cafeína) fueron liofilizados (liofilizador OPERON modelo FDU-7006) durante 48 horas, bajo las condiciones de 0 atm y -83°C. Seguidamente, se quitó la cáscara, fueron molidos usando un mortero y se guardaron en el congelador a -20°C.

Para la extracción de grasas se tomó 2 g de cacao molido en un falcon, se agregaron 7 ml de hexano y se colocó en baño ultrasónico a 40°C por 20 minutos. Se centrifugó a 25°C/7830 rpm durante 10 minutos y se descartó el sobrenadante. La muestra desgrasada se dejó por 24 horas en la capilla de extracción con el fin de eliminar por completo el hexano residual.

La muestra fue sujeta de extracción con 10 ml de metanol- agua a una proporción de 15:6. Se colocó en baño ultrasónico a 40°C por 20 minutos, se centrifugó a 7830 rpm por 10 minutos, y el sobrenadante se vertió en un falcon, con potencial de 50 ml. Todo lo anterior, se ejecutó tres veces consecutivas, se combinaron las tres extracciones y se nivelaron (con el mismo solvente de extracción) a un volumen de 27.5 ml. El sobrenadante, se volvió a centrifugar por 10 min a 25°C/7380 rpm, y se filtró a través de filtros de 0.45 µm, marca Sartorius stedim biotec. Finalmente, se incorporaron en viales para HPLC.

Los carbohidratos, alcoholes y ácidos orgánicos se extrajeron según lo descrito por Moreira, Miguel, Duarte, Dias, & Schwan, (2013) con pocas modificaciones. Se pesaron 2.55 g de pulpa de cacao (los granos de cacao se pelaron para obtener solo la cascara+ pulpa) y de cada muestra se hicieron dos extracciones. Se agregó 25 ml de agua Milli Q, y colocaron en agitación en el shaker a 25°C/300 rpm, por media hora; se centrifugó por 20 minutos a 5°C/ 7830 rpm, y se extrajo el sobrenadante e incorporó en un nuevo falcon.

Dicho procedimiento se repitió dos veces. Se combinaron las dos extracciones y se nivelaron (con el mismo solvente de extracción, en este caso agua Milli Q) a un volumen de 50 ml. Seguidamente, la solución se filtró al vacío con un papel filtro numero 1 marca ADVANTEC, 55 mm de circunferencia y una porosidad de 6 µm. Se volvieron a filtrar por el micro poro de 0.45 µm (Sartorius stedim biotec), y se incorporaron en los viales para HPLC.

3.4.3 HPLC para compuestos fenólicos y metilxantinas

El análisis cromatográfico fue realizado mediante el sistema Agilent serie 1200, el cual consta de un muestreador automático para viales de 2 ml, una bomba cuaternaria, un detector de diodos (DAD), y un detector ultravioleta (UV). Los componentes fueron separados utilizando una columna Zorbax Eclipse Plus C18 (4,6 x 100 mm, 3,5 µm, Agilent, Estados Unidos).

El sistema solvente aplicado consistió en, eluyente A: agua desionizada con 1% ácido acético y eluyente B: acetonitrilo. El gradiente de elución se programó con un flujo de 1 ml/min, de la siguiente manera: 100% A por 10 min; 75% A por 5 min, 50% A por 2 min; 0% A por 1 min; con un post-acondicionamiento de 1 min. La detección se realizó con el DAD a longitudes de onda de λ 275.4 nm.

La identificación de los compuestos se realizó con patrones de cafeína, (-) epicatequina, y teobromina utilizando las mismas condiciones descritas del método de HPLC. Los resultados son expresados en mili unidades de absorbancia por segundo (mUA*s), cuyos valores medios de las desviaciones estándar representan un valor aproximado del contenido de tales compuestos, sin embargo, no alude con exactitud la concentración por gramo de cacao desgrasado. Cabe resaltar que la cafeína sí se logró cuantificar, mediante curva de calibración, cuyos valores fueron expresados en miligramos por gramo de grano desgrasado.

3.4.4 HPLC para azúcares reductores, etanol, ácido láctico y ácido acético

La separación de los compuestos fue efectuada también por medio de cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC (Agilent serie 1200)) por medio del detector de índice de refracción (IR), configurado con polaridad positiva y temperatura de la unidad óptica y columna de 55°C. Con fase móvil en la celda de referencia, y un volumen de inyección de 10µl a través de la columna Hi plex-H (3.0 x 5.0 mm, 8 µm, Agilent, Estados Unidos). Además, los analitos se eluyeron isocráticamente con 5 mM de ácido sulfúrico (H₂SO₄) grado HPLC a un volumen de inyección de 0.6 ml/min durante 30 min.

La identificación y cuantificación de los compuestos se realizó por medio de patrones de D- (+) glucosa, fructosa, sacarosa, ácido láctico y ácido acético bajo las mismas condiciones del método de HPLC. La cuantificación se realizó mediante curvas de calibración para cada compuesto, cuyos valores medios de las desviaciones estándar se representan como miligramos por gramo de pulpa.

3.5 Diseño experimental

La unidad observacional corresponde a la misma que la unidad experimental, que estuvo conformada por un kilogramo de cacao en baba de cada grupo genético, híbrido o clon del CATIE. Como se mencionó anteriormente, el kilogramo se formó con muestras de cacao de diferentes accesiones con la finalidad de controlar la variabilidad que podría estar generando el grupo genético. Se estableció un diseño completamente aleatorizado (DCA) con tres repeticiones para cada grupo genético.

En cuanto a la estructura de tratamiento es bifactorial con interacción, donde el primer factor tiene cuatro niveles correspondientes a los cuatro grupos genéticos del CATIE y en el caso de cacaos comerciales tiene cinco niveles correspondientes a los cinco genotipos estudiados (Clones CATIE de Guatuso, Clones CATIE de Upala, Híbridos de Pavas Upala, Híbridos Cuatro Bocas de Upala e Híbridos de Guatuso) y el segundo factor es el tiempo de fermentación con siete niveles correspondientes a cada duración en la que se tomaron las muestras.

Se utilizó un diseño bifactorial con 3 repeticiones por tratamiento, la unidad experimental consistió en los granos que representaron un grupo genético ó genotipo, y la unidad observacional fueron los compuestos químicos evaluados.

3.6 Análisis de datos

Para determinar el efecto de los tratamientos sobre las variables de respuesta estudiadas (pH, azúcares, ácidos orgánicos, etanol, metilxantinas y epicatequina), se realizó un análisis de varianza (ANOVA) con medidas repetidas en el tiempo bajo la teoría de los modelos lineales mixtos. El modelo lineal para el experimento bifactorial fue el siguiente:

$$Y_{ijk} = \mu + \alpha_i + \gamma_j + \delta_{ij} + \varepsilon_{ijk}$$

con: i = 1 ... 4, j = 1 ... 10, k = 1 ... 3

Y_{ijk} : variable de respuesta del i-ésimo grupo genético, j-ésimo tiempo de fermentación y la k-ésima repetición.

μ : media general

α_i : efecto de la i-ésimo grupo genético.

γ_j : efecto de la j-ésimo tiempo de fermentación

δ_{ij} : efecto adicional (interacción) para la combinación de los niveles i de grupo genético y j tiempo de fermentación.

ε_{ijk} : término de error que se distribuye normal independiente con media cero y varianza constante.

Además, al tener evaluaciones en el tiempo y la unidad observacional se midió durante los distintos tiempos de fermentación, los errores se encuentran correlacionados, para poder cumplir con el supuesto de independencia, se incluyó el ajuste de sujeto dentro del modelo como efecto aleatorio o se ajustó una estructura de correlación. Se comprobaron los supuestos del ANOVA con gráficos diagnósticos (cuantiles de los términos de error, gráficos de residuos y gráficos de residuos vs. predichos). Se escogió el mejor modelo en función de los criterios de Akaike (AIC) y de información Bayesiano (BIC). En las variables donde existieron diferencias estadísticas entre los tratamientos, se realizó las comparaciones de medias por medio de la prueba de Prueba de Di Rienzo, Guzmán y Casanoves (DGC) ($p \leq 0.05$) permitiendo la formación de grupos excluyentes y no transición entre tratamientos.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Identificación de los microorganismos aislados e inoculados

De acuerdo con la identificación microscópica por medio de las pruebas de tinción Gram, se determinó que tanto la levadura como la acetobacter fueron Gram negativas (Fig. 5 y 6). Ya que según lo establecido por Silva *et al.*, (2010) los microorganismos Gram positivos son de color púrpura y los microorganismos Gram negativos son rojos.

En el caso de la identificación molecular, para la levadura se generaron productos de PCR de aproximadamente 600 y 750 pb (pares de bases) con los cebadores ITS (Anexo 2), 1100 pb con LR6/LROR (Anexo 2), 1000 pb con los cebadores CA1/CA5R (Anexo 3) y CA21/CA22R (Anexo 4). El PCR para la identificación de la acetobacteria con los cebadores para el gen 16S produjo una banda de 1000 pb (Anexo 4). Los análisis de secuenciación de tales productos de PCR determinaron que la levadura correspondía a *H. opuntiae*, y la acetobacteria pertenecía al género *Acetobacter* por lo tanto se expresó como *Acetobacter* spp.

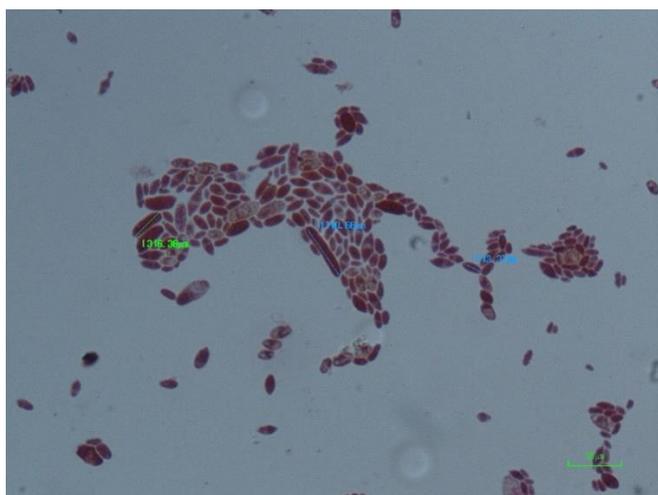


Figura 5. *H. opuntiae*. Gram negativa. 100X.

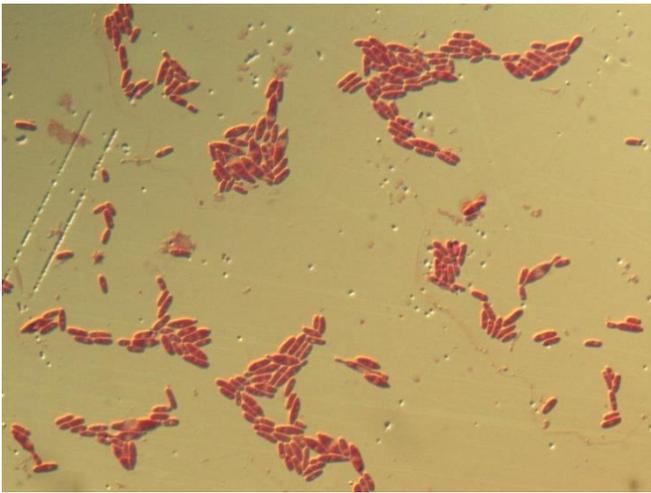


Figura 6. *Acetobacter* spp. Gram negativa. 100X.

Los resultados de tinción Gram coinciden con lo que establece la literatura con respecto a las especies identificadas e inoculadas en este estudio. Debido a que como establece Facco, Paula, Has, & Grossa, (2016) el microorganismo *H. opuntiae* se caracteriza por poseer tinción Gram negativa (Fig. 5), y su tolerancia a valores bajos de pH. En el caso de la AAB utilizada, estudios por Guillermo *et al.*, (2000) confirman que las bacterias del ácido acético (AAB) son células Gram-negativas (Fig. 6), elipsoidales en forma de bastón y de metabolismo aeróbico obligatorio. Se clasifican en la familia Acetobacteraceae como una rama de las bacterias acidófilas en la subdivisión de las Proteobacterias (De Ley, Gillis, & Swings, 1984; Sievers, Alonso, Gianotti, & Teuber, 1996).

Con respecto a la identificación de la levadura aislada, investigaciones han corroborado la presencia de *H. opuntiae* como la principal levadura durante las primeras horas de fermentación en Ghana (en fermentaciones apiladas) (Heide-Marie *et al.*, 2009a) y Costa de Marfil (cajas de madera). Asimismo, *H. opuntiae* ha sido anteriormente descrita y aislada en productos diferentes al cacao, tales como cactus podridos (Cadez, Raspor, & Smith, 2006), fermentaciones de orujo y vino (Bovo *et al.*, 2009; Garofalo *et al.*, 2016; Wang & Liu, 2013), granos de café (de Melo Pereira *et al.*, 2014), y jugo de piña (Chanprasartsuk, Prakitchaiwattana, & Sanguandeeikul, 2013).

Estudios realizados por Chandler, Eisen, & Kopp, (2012) han detectado comunidades de levadura dominadas por *Hanseniaspora* spp. mediante la secuenciación de alto rendimiento en *Drosophila* recolectada en frutas. Se establece que probablemente la asociación de estas moscas drosófilas con las comunidades de levadura conduzca a la dispersión de la levadura (Gilbert, 1980; Lam & Howell, 2015; Markow & O'Grady, 2008; Palanca, Gaskett, Günther, Newcomb, &

Goddard, 2013). En adición, Papalexandratou *et al.*, (2013) menciona que en la fase temprana de fermentación (primeras 24 h), cuando las levaduras son más importantes, la *Hanseniaspora* es la levadura dominante, debido a su baja tolerancia al etanol y a su baja resistencia al calor.

En el caso de la AAB, varios autores confirman que las especies pertenecientes al género *Acetobacter* son las más comunes en fermentaciones de cacao (Carr, Davis, & Dougan., 1979; Passos & Passos., 1985; Saltini *et al.*, 2013; R. Schwan & Wheals, 2004; Thompson, Miller, & Lopez., 1997). Además de ser la única especie de bacteria de ácido acético presente hasta el final de las fermentaciones (Lefeber, Janssens, Moens, Gobert, & De Vuyst, 2011). Predominan a las 72-96 h de la fermentación debido a que su metabolismo mejora por la presencia de oxígeno. Su principal función es la oxidación de etanol a ácido acético (Saltini *et al.*, 2013).

4.2 Comportamiento bioquímico en el sistema de micro fermentación

Pereira *et al.*, (2012) señala que varios estudios han intentado fermentar pequeñas cantidades de cacao (≤ 20 kg) sin obtener éxito en el aumento óptimo de temperatura gradual, logrando alcanzar apenas los 35-37°C. Ante esto, la presente metodología planteada de micro fermentación fue diseñada simulando los aumentos observados en una fermentación tradicional de manera artificial. Además, se utilizó un cultivo iniciador, ya que como algunos investigadores mencionan, para mejor control del proceso de fermentación se recomiendan el uso de estos (Crafack *et al.*, 2013; Leal, Gomes, Efraim, De Almeida Tavares, & Figueira, 2008; Lefeber, Papalexandratou, Gobert, Camu, & De Vuyst, 2012; R. Schwan & Wheals, 2004b).

Las sucesiones microbiológicas asociadas a la fermentación del cacao han sido ampliamente estudiadas. Camu *et al.*, (2007a) mencionan que además de las acciones de las levaduras, las actividades de LAB (bacterias de ácido láctico) y AAB (bacterias de ácido acético) son esenciales para la producción de cacao de alta calidad. No obstante, algunos autores señalan la falta de claridad o consenso en cuanto a la función de las bacterias del ácido láctico (Ho, Zhao, & Fleet, 2015a; Thi *et al.*, 2014). Sus actividades metabólicas pueden generar acumulación de ácido láctico, la cual puede ser perjudicial para la calidad del grano y chocolate. Ante esto, en el presente estudio, se excluyó el uso de LAB, y solo se aisló, identificó e inculó una levadura y AAB (*H. opuntiae* y *Acetobacter* spp.).

De acuerdo al comportamiento de las diferentes variables de estudio, se deduce que hubo una homogeneidad en el crecimiento de microorganismos en ambas fermentaciones. Esto porque entre las genéticas estudiadas, tanto en los grupos genéticos del CATIE como en los comerciales, las transformaciones bioquímicas en pulpa de azúcares, ácidos orgánicos y etanol fueron no significativas estadísticamente entre los tratamientos (genéticas) a lo largo de la fermentación. Dichos hallazgos indican que el estudio del genotipo no es una variable distintiva en el contenido y transformación de dichos compuestos presentes en pulpa durante la metodología de fermentación planteada. Estudios por Romero & Zambrano, (2012) también han reportado diferencias no significativas ($p > 0.05$) entre los contenidos (%) de fructosa, glucosa y sacarosa presentes en pulpa fresca de diferentes cultivares de cacao tipo Criollos, híbridos y forasteros, lo cual posiblemente tenga un impacto en el tiempo de fermentación

Autores explican la importancia de factores claves para una fermentación microbiana exitosa del grano, entre ellos se encuentran tales como temperatura, pH y tensión de oxígeno, la calidad microbiológica de la masa inicial de pulpa y el metabolismo de los sustratos disponibles en la pulpa del cacao. (Ardhana & Fleet, 2003; Camu et al., 2007; De Vuyst & Weckx, 2010; R. Schwan & Wheals, 2004b). De dichos factores mencionados, temperatura, aireación y microbiología del medio (controlados en la fermentación), y la similitud del contenido inicial de la pulpa de los diferentes genotipos, atribuyen ser variables de gran importancia que explican el comportamiento homogéneo de los compuestos estudiados en pulpa durante la metodología de fermentación establecida.

La fermentación de cacao ocurre en dos pasos: la primera etapa involucra reacciones microbianas que tienen lugar en la pulpa. La segunda fase involucra varias reacciones hidrolíticas que ocurren dentro de los cotiledones (B. Biehl *et al.*, 1985; R. Schwan & Wheals, 2004b). Tales cambios bioquímicos dentro del grano se observaron dentro del grano a través del comportamiento de fenólicos y metilxantinas a lo largo de la fermentación. Cuyos porcentajes de pérdida, así como las pruebas de corte indican un grado óptimo de fermentación.

Al igual que el comportamiento de los compuestos estudiados en pulpa, los contenidos de metilxantinas y fenólicos dentro del grano cambian en función del tiempo de fermentación. Los cacao comerciales a diferencia de los grupos genéticos del CATIE, presentan cambios significativos en la interacción genética por tiempo de fermentación. Tales respuestas se atribuyen

a la localidad de las muestras de cacaos comerciales, así como el manejo agronómico. Debido a esto, estudios han confirmado que dependiendo de la ubicación geográfica, donde las variedades cultivadas son idénticas, cada una tiene características propias, que distinguen a una de otra, incluyendo desde el tamaño del grano, la composición química y las características organolépticas, hasta el grado de fermentación (Clapperton *et al.*, 1994; Counet, Ouwerx, Rosoux, & Collin, 2004; Jalil & Ismail, 2008; Thompson, Miller, & Lopez, 2007b).

Se determinó que entre los grupos genéticos el contenido promedio de epicatequina indiferentemente del tiempo de la fermentación varía según el grupo genético. En el caso de los cacaos comerciales, la cafeína resultó ser el compuesto distintivo entre los genotipos analizados. Investigaciones exponen que la composición de los compuestos fenólicos y metilxantinas varía con el genotipo y tiene una influencia en el sabor amargo del cacao (Brunetto *et al.*, 2007; Clapperton, 1992; Clapperton *et al.*, 1994; Figueira *et al.*, 1997; Forsyth & Quesnel, 1963). Incluso, correlacionan el contenido de cafeína con la teobromina asociado al genotipo de cacao y/o al origen geográfico (Brunetto *et al.*, 2007; Luis C. Carrillo, Londoño-Londoño, & Gil, 2014; Davrieux, Assemat, Boulanger, & Cros, 2004).

4.3 pH en pulpa

Con respecto a contenido de pH entre los genotipos estudiados, no se encontraron diferencias significativas; sin embargo, durante la fermentación sí se encontraron cambios estadísticamente significativos (Fig. 7 y 8). Todas las fermentaciones se caracterizaron por presentar un pH inicial de 3.56-3.7. Dichos valores presentan un incremento decisivo del pH aproximadamente de 4.49-4.7 en las últimas horas de fermentación (120-144h). Asimismo, se puede observar el marcado comportamiento del pH en función de la fase fermentativa. El tiempo de 72 horas pauta la diferencia según el comportamiento de pH para distinguir la fase anaeróbica de la aeróbica.

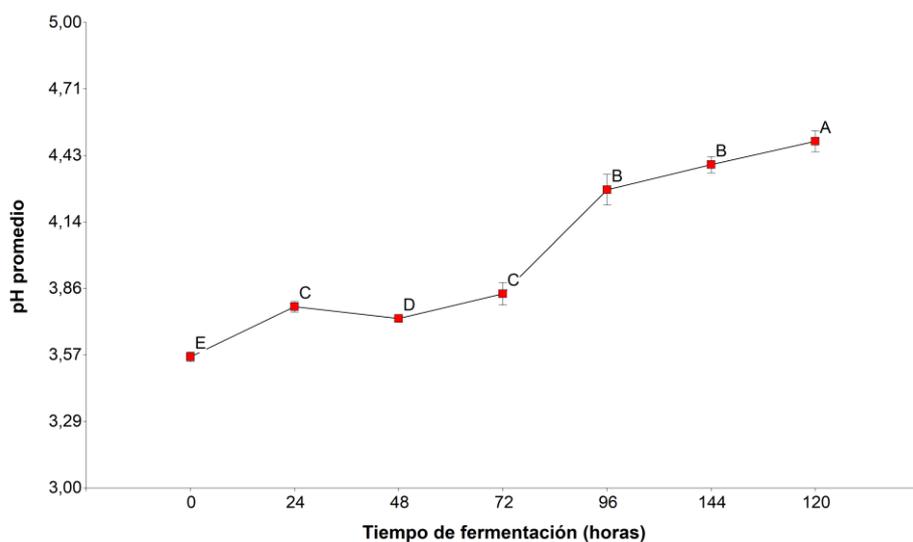


Figura 7. Gráfico del comportamiento del pH en pulpa de los cacaos comerciales estudiados durante la fermentación en función del tiempo. Medias con letra común no son diferentes estadísticamente ($p > 0.05$).

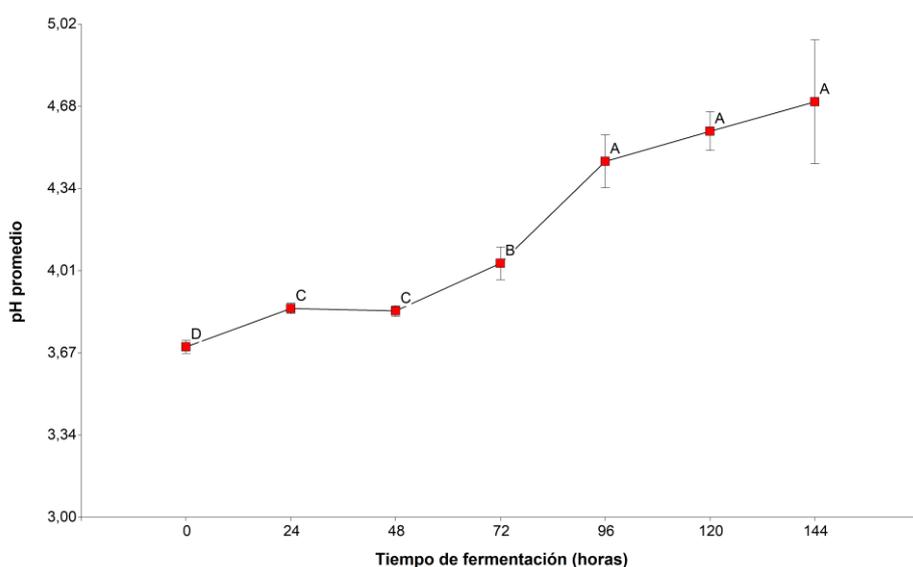


Figura 8. Gráfico del comportamiento del pH en pulpa de los grupos genéticos del CATIE estudiados durante la fermentación en función del tiempo. Medias con letra común no son diferentes estadísticamente ($p > 0.05$).

Resultados similares de pH han sido reportados por Camu *et al.*, (2007a) en fermentaciones espontáneas apiladas de 250-1000 kg de híbridos de cacao pertenecientes a los grupos Criollo y Forasteros, los cuales datan incrementos desde pH 3.5 hasta un pH final de 4-4.3. Los mismos autores explican que ese ligero aumento en pH se debe a que el ácido cítrico y los azúcares se

convierten en ácido acético, ácido láctico y manitol. Fermentaciones tradicionales en cajas de madera realizadas en tres fincas en Indonesia, también reportaron aumentos similares de pH en pulpa de 3.7-3.9 a 4.8-4.9 (Ardhana & Fleet, 2003).

Por otra parte Afoakwa, (2014) establece, la fermentación de cacao se divide en una fase anaeróbica dominada por levaduras y bacterias ácido lácticas; y una fase aeróbica caracterizada por la presencia de AAB. De hecho, investigadores validan el metabolismo microbiano como el responsable del cambio de pH debido a las conversiones enzimáticas y no enzimáticas que se desencadenan dentro y fuera del grano (Lefeber *et al.*, 2012; Papalexandratou *et al.*, 2013).

En los gráficos anteriores se puede observar que durante las primeras horas (0h, 24h, 48h y 72h) el pH presenta un leve aumento, pero manteniendo sus valores de pH menores a 4. Dichas características describen la fase anaeróbica, ya que como establece De Vuyst & Weckx, (2010) durante los primeros 3–4 días coincide con presencia de levaduras y LAB en condiciones de disponibilidad limitada de oxígeno (debido al empaquetamiento apretado de la masa de pulpa de cacao) y un pH por debajo de 4.0.

Como fue mencionado, se puede observar una marcada fase aeróbica a partir de las 72h cuyos valores rondan a ser mayores de 4.38-4.46. De Vuyst & Weckx, (2010) establecen que la segunda fase es la fase oxidativa aeróbica, que coincide con el crecimiento de AAB, las cuales son reconocidas por su potencial única de oxidar etanol a ácido acético en medios neutros y ácidos (pH 4.5) (Guillamo *et al.*, 2000). Por lo tanto, según el comportamiento de pH podríamos atribuir, una fermentación anaeróbica los primeros 3 días seguida con una fermentación aeróbica los 3 días restantes.

4.4 Azúcares, etanol y ácidos orgánicos en pulpa durante fermentación de cacao

No se encontraron diferencias significativas en el contenido y comportamiento de azúcares, etanol y ácidos orgánicos en pulpa entre los grupos genéticos del CATIE o los cacaos comerciales (Fig. 9 y 10). Exceptuando el contenido de fructosa entre los cacaos comerciales, sí se encontraron diferencias significativas entre los genotipos (Fig. 11). No obstante, en ambos ensayos los cambios de tales compuestos a lo largo del tiempo de fermentación fueron estadísticamente significativos.

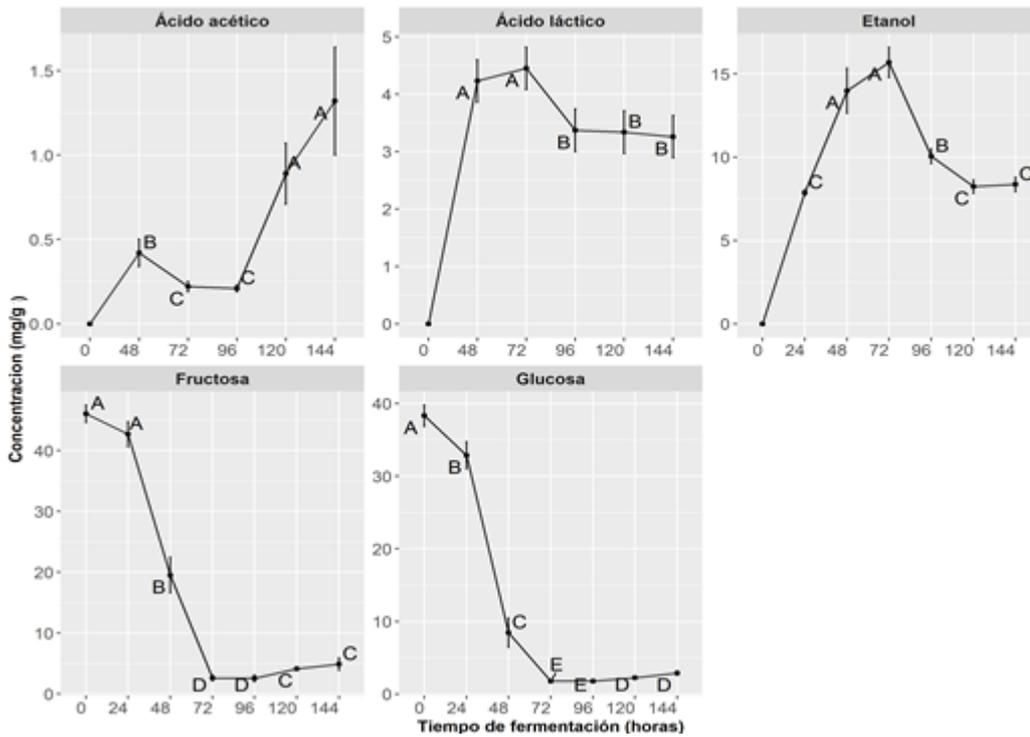


Figura 9. Gráfico del comportamiento de azúcares, etanol y ácidos orgánicos en pulpa de los grupos genéticos del CATIE durante la fermentación en función del tiempo. Medias con letra común no son diferentes estadísticamente ($p > 0.05$).

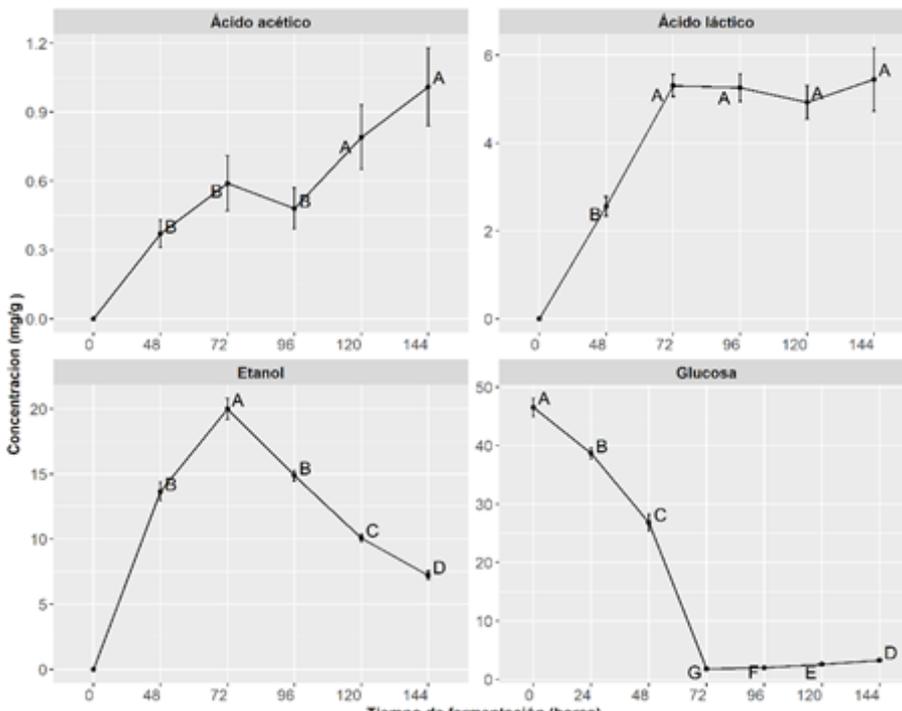


Figura 10. Gráfico del comportamiento de glucosa, etanol y ácidos orgánicos en pulpa de los cacaos comerciales durante la fermentación en función del tiempo. Medias con letra común no son diferentes estadísticamente ($p > 0.05$).

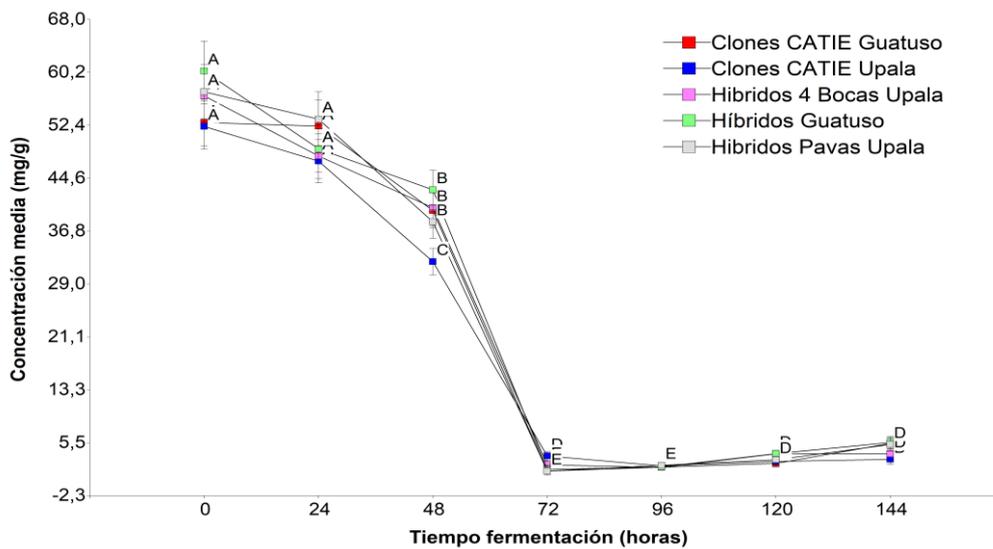


Figura 11. Gráfico del comportamiento de fructosa (mg/g) en pulpa de los cacaos comerciales durante la fermentación en función del tiempo. Medias con letra común no son diferentes estadísticamente ($p > 0.05$).

Con respecto a los resultados del análisis de azúcares, en ambos experimentos comerciales y grupos genéticos CATIE la glucosa (50-38.32 mg/g respectivamente) y la fructosa (60-46.06 mg/g respectivamente) fueron los principales y únicos compuestos fermentables en la pulpa recién extraída (0 h). Estas concentraciones son consistentes (55.7-42.8 mg/g glucosa y 67.2-50.5 mg/g fructosa) con las reportadas por Papalexandratou, Vrancken, de Bruyne, Vandamme, & de Vuyst, (2011) en pulpa fresca de cacaos híbridos provenientes de los grupos genéticos: Criollo y Forastero (fermentaciones de 1500 kg en grano) en dos fincas en Brasil.

La sacarosa no fue detectada al principio de la fermentación, probablemente porque fue hidrolizada en glucosa y fructosa debido al adecuado tiempo de cosecha de mazorcas maduras. Tal y como establecen varios autores la concentración de sacarosa, fructosa y glucosa varía en función de la variedad y la madurez del fruto; las mazorcas inmaduras contienen una mayor proporción de sacarosa y las mazorcas maduras contienen principalmente fructosa y glucosa (Lehrian & Patterson, 1984; Thompson, Miller, Lopez, & Camu, 2013; Thompson *et al.*, 2007b).

El mayor consumo de estos compuestos fue observado después de la culminación de la fase anaeróbica (hasta el tiempo 72 horas). Resultados similares presentaron Batista, Ramos, Ribeiro, Pinheiro, & Schwan, (2015) en el estudio de la dinámica de *Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia kluyveri* y *Hanseniaspora uvarum* durante fermentaciones espontáneas e inoculadas de cacao, las cuales datan que en ambos tratamientos el consumo de carbohidratos, etanol y ácidos

orgánicos en pulpa se observó a las 70 h de fermentación. Hallazgos reportados por R. Schwan & Wheals, (2004b) exponen que altos contenidos de azúcares en la pulpa de cacao inducen estrés osmótico de las células de levaduras y LAB. Esto explica la lenta hidrólisis de los azúcares fuera del rango (24-48 h) recomendado por la literatura (Ardhana & Fleet, 2003; Barel, 1998; Camu et al., 2007; De Vuyst & Weckx, 2010; R. Schwan, Rose, & Board, 1995; R. Schwan & Wheals, 2004a; Thompson et al., 2013, 2007a).

Es importante mencionar que, la fase anaeróbica en este proceso de fermentación se extendió hasta las 48 horas, ya que según De Vuyst & Weckx, (2010) la fase 1 (también denominada crecimiento anaerobio de las levaduras), comprende las primeras 24–48 h de fermentación de cacao. Tal comportamiento del consumo de azúcares por medio de levaduras (responsables de tal proceso) no se vio estrictamente ligado a las primeras horas de las condiciones anaeróbicas de la fase 1. En confirmación, R. Schwan & Wheals, (2004b) exponen que bajo condiciones como la acidez inicial de la pulpa (pH 3.6) junto con bajos niveles de oxígeno, la colonización de levaduras promueve el uso de carbohidratos en pulpa tanto en condiciones aeróbicas como anaeróbicas. Un ejemplo de ello es el género *Saccharomyces* que fermenta glucosa para producir etanol incluso en condiciones aeróbicas. Dicho efecto, distingue a *Saccharomyces* de levaduras estrechamente relacionadas como *Kluyveromyces* que, por ejemplo, no realizan fermentación aeróbica (Broach, n.d.).

Cabe mencionar que, el consumo de azúcares no solo está relacionado a la actividad de las levaduras, sino que las LAB también contribuyen en tal proceso principalmente entre las 24-72 h. Autores explican que durante la fermentación las LAB fermentan azúcares de la pulpa, principalmente glucosa y fructosa, a ácido láctico y cantidades menores de etanol y ácido acético (Camu et al., 2007; Camu, Winter, et al., 2008; De Vuyst & Weckx, 2010; Lefeber, Gobert, Vrancken, Camu, & De Vuyst, 2011).

A las 72 horas de fermentación en los grupos genéticos del CATIE (Fig. 9), tanto la glucosa como la fructosa disminuyeron sus concentraciones a 95.38% y 94.31%. Posteriormente a lo largo de la fermentación se observaron cambios significativos, con una concentración final de 2.89 mg/g glucosa y 4.88 mg/g fructosa residual, y un porcentaje de pérdida alrededor de 92.46% y 89.40% respectivamente. Tales resultados concuerdan con los registrados (cantidades residuales de azúcares no reductores de 2.03 mg/g, cuya disminución fue 89%) por Afoakwa, Quao, Takrama,

Budu, & Saalia, (2011) en el análisis del efecto de pre condicionamiento de la pulpa durante fermentación (50 kg de granos de cacao en bulto).

De igual modo, los cacaos comerciales (Fig. 10) presentaron una drástica disminución de glucosa a las 72 horas del 96.07%, a partir de tal momento con aumentos significativos, cuyas concentraciones finales producto de la fermentación microbiana fueron de 3.24 mg/g. Diferentes resultados se obtuvieron en el comportamiento de fructosa (Fig. 11), para lo cual confirma la hipótesis que existen diferencias significativas entre genética y tiempo de fermentación.

Los genotipos comerciales al igual que los grupos genéticos del CATIE presentaron su disminución máxima a las 72 h y sus porcentajes de pérdida fueron de 97.40% para Híbridos Guatuso, 97.63% para Híbridos Pavas de Upala, 96.70% para Híbridos de Cuatro Bocas Upala, y 97.42% para Clones CATIE Guatuso. Se observa una excepción en los Clones de Upala, cuya disminución máxima se da a las 96 h, con 95.98% de cambio. No obstante, todos los genotipos presentan concentraciones finales estadísticamente similares entre 5.56- 3.08 mg/g.

La concentración de etanol en la pulpa aumentó a las 72 horas y luego disminuyó gradualmente a medida que progresaba la fermentación (Fig. 9 y 10). Thi *et al.*, (2014) explica que estas cinéticas se deben al movimiento dentro y fuera del grano. Las concentraciones máximas de etanol detectadas a las 72 horas fueron de 19.99 mg/g en comerciales y 15.69 mg/g en grupos genéticos del CATIE, coincidiendo con el consumo máximo de glucosa, debido a que los azúcares presentes en pulpa son convertidos en etanol y CO₂ por levaduras.

La producción de considerables cantidades de etanol es un buen indicador de una óptima fermentación, ya que como establece Roelofsen, (1958) el etanol es un metabolito principal de la fermentación de la pulpa porque se consideraba un agente primario de la muerte del embrión y el inicio de reacciones que conducen al desarrollo del sabor del chocolate. En un estudio realizado en Brasil por Moreira *et al.*, (2013) se compararon la composición microbiológica y química de diferentes híbridos, observándose un incremento similar de etanol con la disminución simultánea de glucosa a las 72 h de fermentación.

Diferentes investigaciones (Camu, Winter, *et al.*, 2008; Lagunes Gálvez, Loiseau, Paredes, Barel, & Guiraud, 2007; Lefeber *et al.*, 2012; Papalexandratou *et al.*, 2011; Thi *et al.*, 2014) han

reportado concentraciones máximas de etanol en pulpa, cuyos valores varían entre 5–20 mg/g a valores tan altos como 30–60 mg/g (Ardhana & Fleet, 2003; Roelofsen, 1958; R. F. Schwan, 1998). Tales discrepancias podrían explicarse por variaciones en las cantidades iniciales de azúcares presentes en la pulpa, las especies de levaduras que se desarrollan durante la fermentación y la falta de estandarización en los métodos utilizados para medir e informar su presencia en la pulpa y las semillas de cacao (Thi *et al.*, 2014).

Según Quesnel, 1965; Roelofsen & Giesberger, (1947) se necesitan concentraciones de etanol que excedan los 40 mg/g para matar el embrión. Dado que, tales concentraciones no se alcanzan en muchas fermentaciones, se considera que el ácido acético es el principal agente que causa la muerte del embrión, aunque su efecto también se ve acompañado por el etanol y el aumento de la temperatura (Camu *et al.*, 2007; Quesnel, 1965). Además, esto inicia cambios bioquímicos en los granos, lo que lleva a la formación de moléculas precursoras para el desarrollo del sabor y color característicos de los granos (Hansen, Del Olmo, & Burri, 1998; Thompson *et al.*, 2001).

Por otra parte, se observa una disminución gradual de etanol después de las 72 horas, resultados que coinciden con los picos más providentes de concentraciones de ácido acético (Fig. 9 y 10). Este es un comportamiento esperado, ya que dentro de las rutas metabólicas de las bacterias AAB (responsables de utilizar el etanol producido) se encuentran ácido acético como producto principal. Tal biotransformación ha sido reportado previamente donde exponen que disminución de etanol en las últimas etapas de la fermentación se debe a su oxidación al ácido acético por las acetobacterias (Camu, Winter, *et al.*, 2008; Lagunes Gálvez *et al.*, 2007; Lefeber *et al.*, 2012; Papalexandratou *et al.*, 2011; Roelofsen, 1958), y a la pérdida debido a la evaporación a medida que aumenta la temperatura de la masa de cacao (Lagunes Gálvez *et al.*, 2007; R. Schwan & Wheals, 2004a).

El metabolismo del etanol en ácido acético se ilustra con las concentraciones más bajas de etanol (7.22 mg/g en comerciales-8.36 mg/g en los del CATIE) obtenidas a las 144 h, en coincidencia con las concentraciones más altas de ácido acético reportadas (1.01 mg/g en comerciales-1.32 mg/g en los grupos del CATIE) en el mismo tiempo de fermentación (Fig. 9 y 10). Resultados similares fueron reportados por Batista *et al.*, (2015) en fermentaciones (tanto espontánea como inoculada con *Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia kluyveri* y *Hanseniaspora*

uvarum) en cajas de madera con 100 kg de granos de cacao, cuyas concentraciones más altas de ácido acético (2.5 and 2.9 g/kg) fueron alcanzadas a las 144h. Esto puede deberse a que las altas temperaturas de la masa de fermentación, (alrededor de 45-50 ° C), favorece la evaporación del etanol sin afectar la concentración de ácido acético al final del proceso.

Las cantidades de ácido acético detectadas en pulpa no fueron las esperadas, ya que las fermentaciones fueron inoculadas con una bacteria ácido acética, con lo que se esperaba mayores concentraciones acéticas. Incluso, en fermentaciones de cacao en masa, la concentración de ácido acético alcanza alrededor del 2.0% m/m (aproximadamente 20 mg/g (Camu et al., 2007; Camu, González, et al., 2008; De Vuyst & Weckx, 2010; Nielsen et al., 2007)). Las concentraciones obtenidas en esta investigación, se pueden atribuir a la difusión de ácido acético de la pulpa hacia la semilla, ya que de acuerdo con Camu, Winter, *et al.*, (2008); De Vuyst & Weckx, (2010) de los tres ácidos de interés (cítrico, acético y láctico) en fermentación, el ácido acético principalmente se ingiere en gran medida al grano, con pequeñas cantidades de ácido láctico y casi nada de ácido cítrico.

Las bajas concentraciones detectadas de ácido acético también pueden atribuirse a la pérdida por evaporación de Brito *et al.*, (2001); así como a la manifestación tardía de condiciones aptas para la expresión total de las acetobacterias, ya que como establece Afoakwa, (2014) temperaturas de 45°C son más favorables para la promoción del crecimiento de bacterias formadoras de ácido acético que reemplazan a los formadores de ácido láctico. Puesto que, como explica Pereira *et al.*, (2012), el programa gradual de temperatura elegido fue diseñado para imitar los aumentos observados en una fermentación tradicional, que permite el crecimiento sucesivo de las levaduras y el LAB (25 a 32°C; 0 a 48 h), seguido por el AAB (40 a 48°C; 60 a 144 h). Esto explica el comportamiento de dichos microorganismos en función de la detección de sus principales productos metabólicos, donde las principales concentraciones de ácido acético se vieron reflejadas en los últimos tiempos de fermentación.

Las concentraciones de ácido láctico en pulpa de cacaos comerciales empezaron a detectarse partir de las 48 h (Fig. 10), seguido por el alcance de concentraciones máximas de 5.31 mg/g a las 72 h. Tal comportamiento concuerda con los resultados encontrados por Rodríguez, Escalona, Orozco, Lugo, & Jaramillo, (2011) en una fermentación de 1000 kg de granos de cacao forastero en México, mediante el uso de cajas de madera. Posteriormente en los cacaos comerciales

las concentraciones permanecieron constantes durante la fermentación; para una concentración final de 5.45 mg/g a las 144 h. Resultados similares fueron hallados por Pereira *et al.*, (2012) en fermentaciones mediante el uso de recipientes plásticos (con 500 g de granos de cacao) incorporados en incubadoras, cuyo contenido final de ácido láctico reportado en la pulpa fue de 6.2 mg/g.

Comportamiento diferente se presentó en los grupos genéticos del CATIE (Fig. 9), en los cuales se alcanza una máxima concentración de 4.45 mg/g a las 72 h, disminuyendo seguidamente hasta una concentración final de 3.26 mg/g a las 144h. Investigaciones por Camu *et al.*, (2007b) muestran datos similares donde el ácido láctico alcanzó una concentración máxima de 1.0 ± 0.06 a 9.0 ± 0.06 mg/g en la pulpa después de 48 h en fermentaciones apiladas de cacao en Ghana.

Según De Vuyst & Weckx, (2010) las concentraciones de ácido láctico finales detectadas en este estudio (3.26 mg/g grupos genéticos del CATIE, 5.45 mg/g cacaos comerciales) concuerdan con el alcance máximo de 0.5% m / m (es decir, 5 mg/g) de tal compuesto de pulpa en masa fermentada de cacao. Asimismo, debido a que las concentraciones de ácido láctico en el caso de los genotipos comerciales se mantuvieron constantes, y en los del CATIE presentaron una disminución de apenas un 26.7% después de alcanzar su pico máximo, permite deducir que altas concentraciones de ácido láctico no fueron transferidas a los granos. Por lo tanto, las concentraciones detectadas no representan un factor que pueda afectar la acidez o calidad del chocolate, ya que como establece Jinap (1994), la producción excesiva de ácido láctico, su migración a los granos y su no volatilidad pueden contribuir a la alta acidez de los granos y a una mala calidad del chocolate.

No obstante, concentraciones más altas, en comparación con las detectadas en este estudio, fueron reportadas por Ho, Zhao, & Fleet, (2015b) durante una fermentación controlada de cacao en presencia de nisina (inhibidor de crecimiento de LAB) donde se produjo ácido láctico (9-10 mg/g) y no se detectó crecimiento de LAB. Tal comportamiento fue atribuido a la acción de ciertas levaduras, ya que como exponen Kurtzman, (2011) y Lachance, (2011), las levaduras podrían ser una fuente potencial de ácido láctico durante la fermentación del cacao, tal es el caso como *K. marxianus* y *P. kudriavzevii*.

Se podría atribuir que los microorganismos presentes en el medio ambiente o ya sea adheridos a las mazorcas o condiciones del medio también contribuyeron en la fermentación. Las cuales, condiciones ambientales y nutricionales del medio (pulpa de cacao) fueron las apropiadas para que prevalecieran la expresión de levaduras y bacterias ácido lácticas. En confirmación, estudios realizados por Lee *et al.*, (2019) mencionan que la presencia de microorganismos ambientales en los entornos de laboratorio donde se utiliza el modelo, así como los microorganismos procedentes de los granos de cacao puedan afectar el estado microbiológico del sistema de fermentación.

4.5 Metilxantinas (teobromina y cafeína) y epicatequina dentro del grano de cacao durante fermentación

De acuerdo con el análisis de datos de fenólicos y metilxantinas, se determinó que los compuestos teobromina, cafeína y epicatequina de los grupos genéticos presentes en el CATIE no presentan diferencias significativas entre sí (Fig. 12, 14 y 16). Sin embargo, el tiempo de fermentación sí resultó ser una variable significativa en el cambio del contenido de tales compuestos. De tal modo, se descarta la variable genética en el contenido y comportamiento de dichos compuestos. Ese comportamiento se puede atribuir a que estos genotipos provienen de la misma zona, además las variables agro climáticas, así como su manejo agronómico son semejantes entre cada grupo genético. Caso contrario, sucedió con los genotipos denominados comerciales, cuyas variables externas no son las mismas entre ellas. Dichas circunstancias se ven reflejadas en el comportamiento de los compuestos teobromina y epicatequina, los cuales presentaron diferencias significativas entre las composiciones iniciales y cambios de los genotipos comerciales durante tiempo de fermentación y entre los genotipos estudiados (Fig. 13 y 17). Mientras la cafeína (Fig. 15) fue el único compuesto cuyo contenido y comportamiento solo resultó ser significativo en función del tiempo de fermentación.

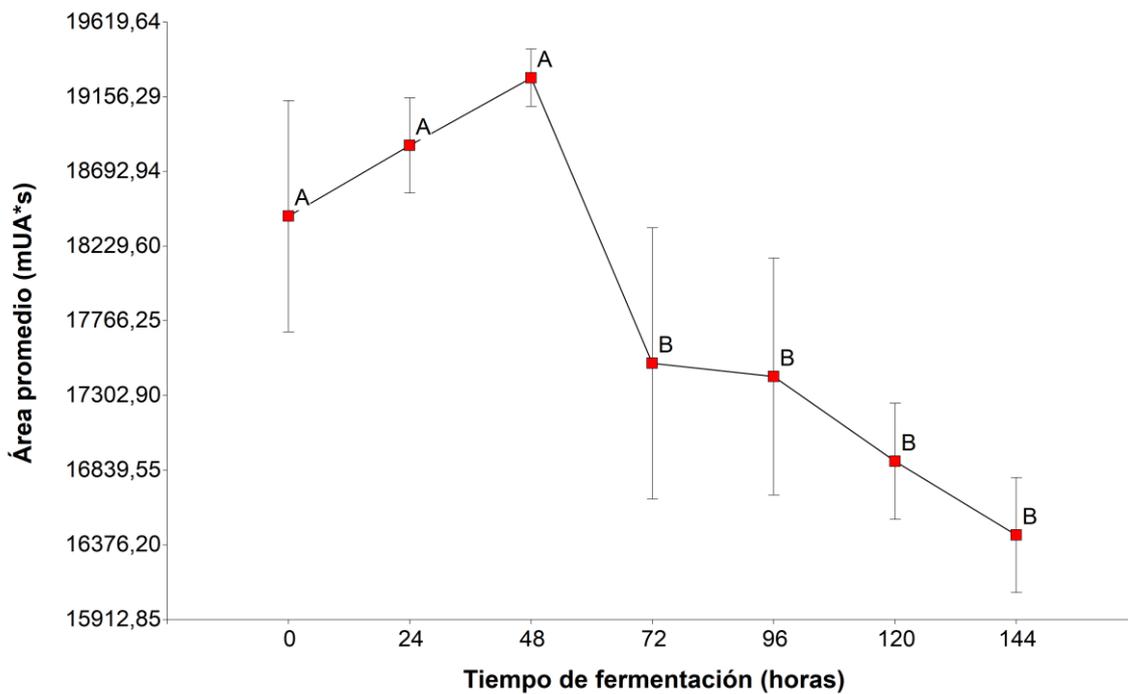


Figura 12. Gráfico del comportamiento de teobromina (mUA*s) en grano de los grupos genéticos del CATIE durante la fermentación en función del tiempo. Medias con letra común no son diferentes estadísticamente ($p>0.05$).

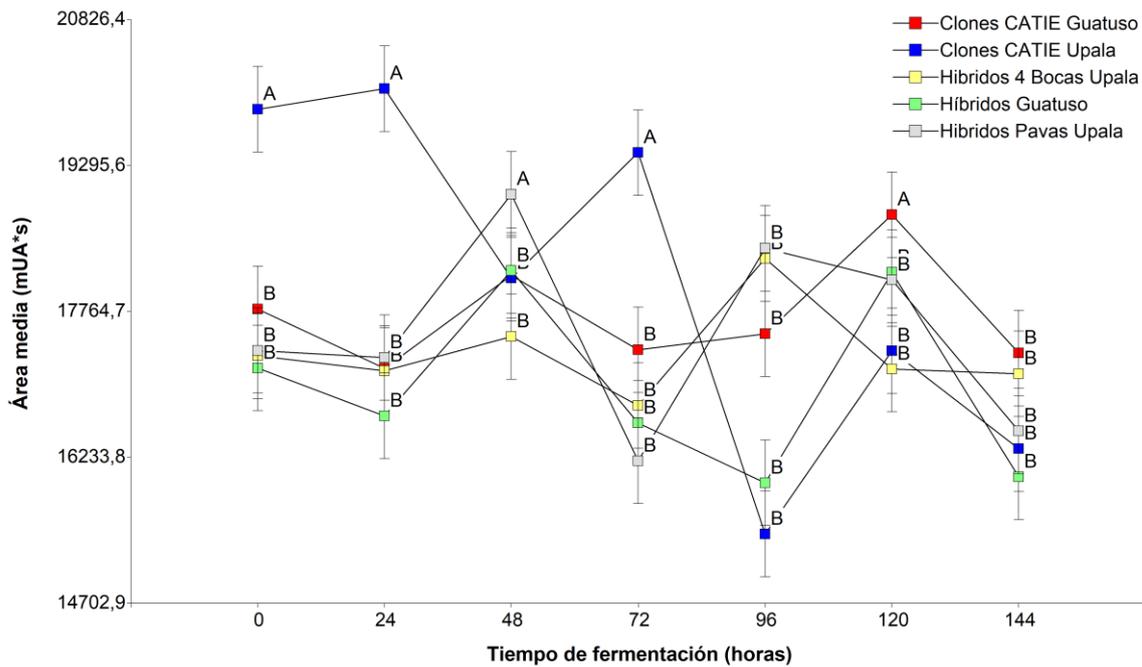


Figura 13. Gráfico del comportamiento de teobromina (mUA*s) en grano de los cacaos comerciales durante la fermentación en función del tiempo. Medias con letra común no son diferentes estadísticamente ($p>0.05$).

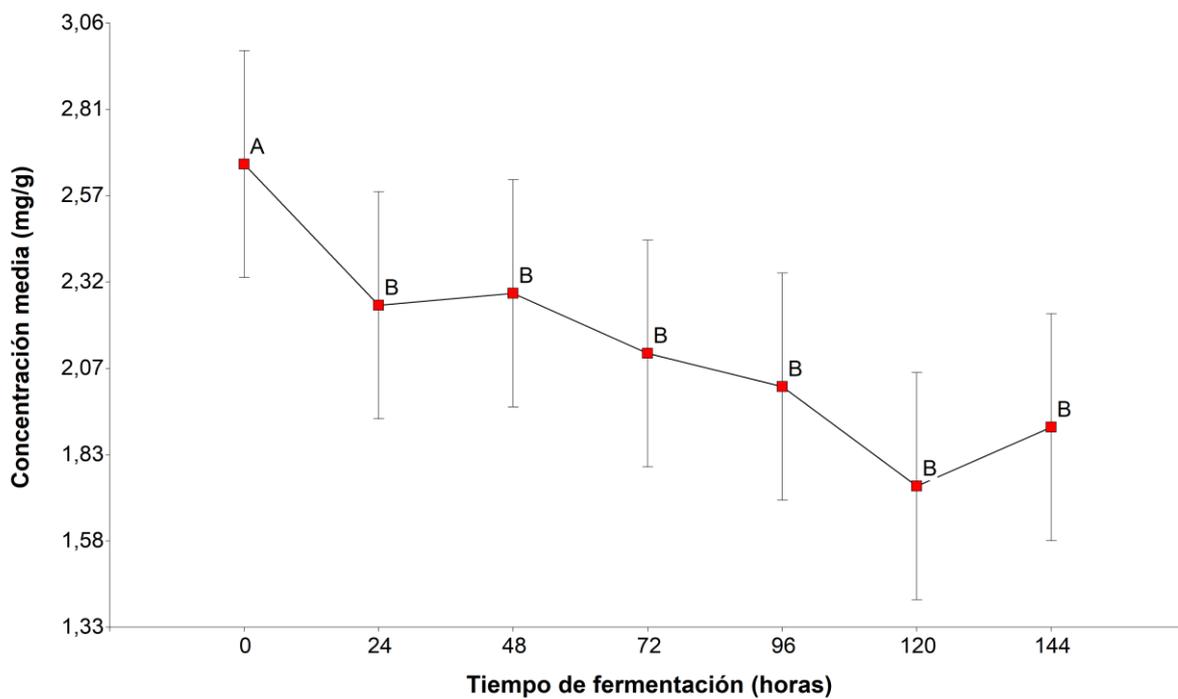


Figura 14. Gráfico del comportamiento de cafeína (mg/g) en grano de los grupos genéticos del CATIE durante la fermentación en función del tiempo. Medias con letra común no son diferentes estadísticamente ($p > 0.05$).

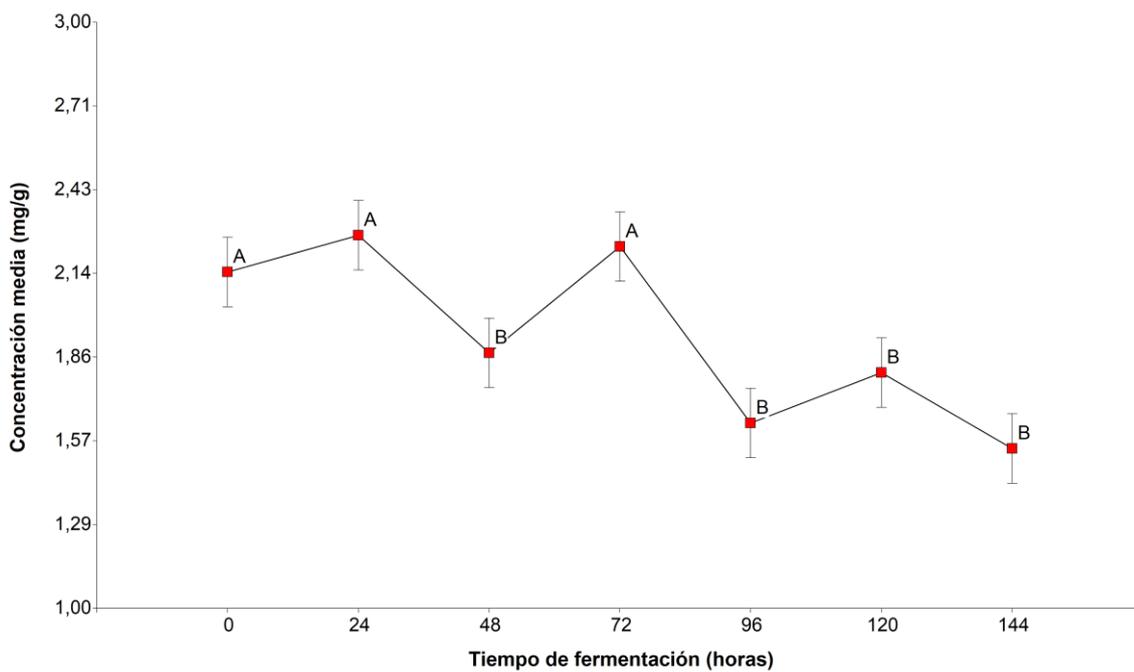


Figura 15. Gráfico del comportamiento de cafeína (mg/g) en grano de los cacaos comerciales durante la fermentación en función del tiempo. Medias con letra común no son diferentes estadísticamente ($p > 0.05$).

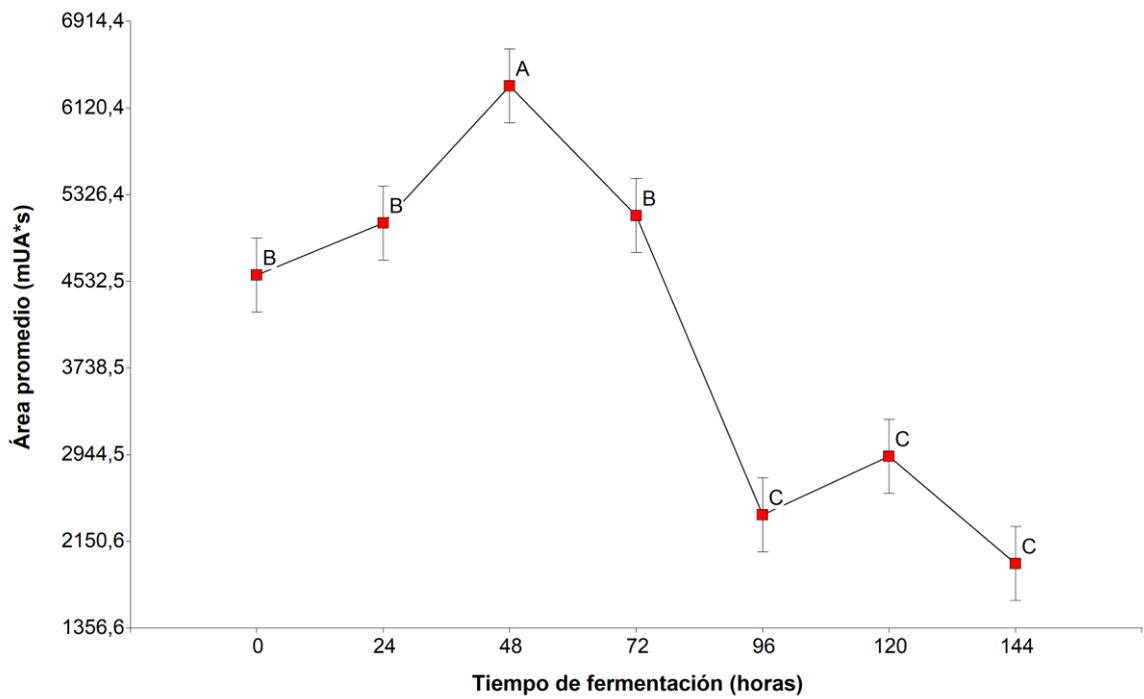


Figura 16. Gráfico del comportamiento de epicatequina (mUA*s) en grano de los grupos genéticos del CATIE durante la fermentación en función del tiempo. Medias con letra común no son diferentes estadísticamente ($p>0.05$).

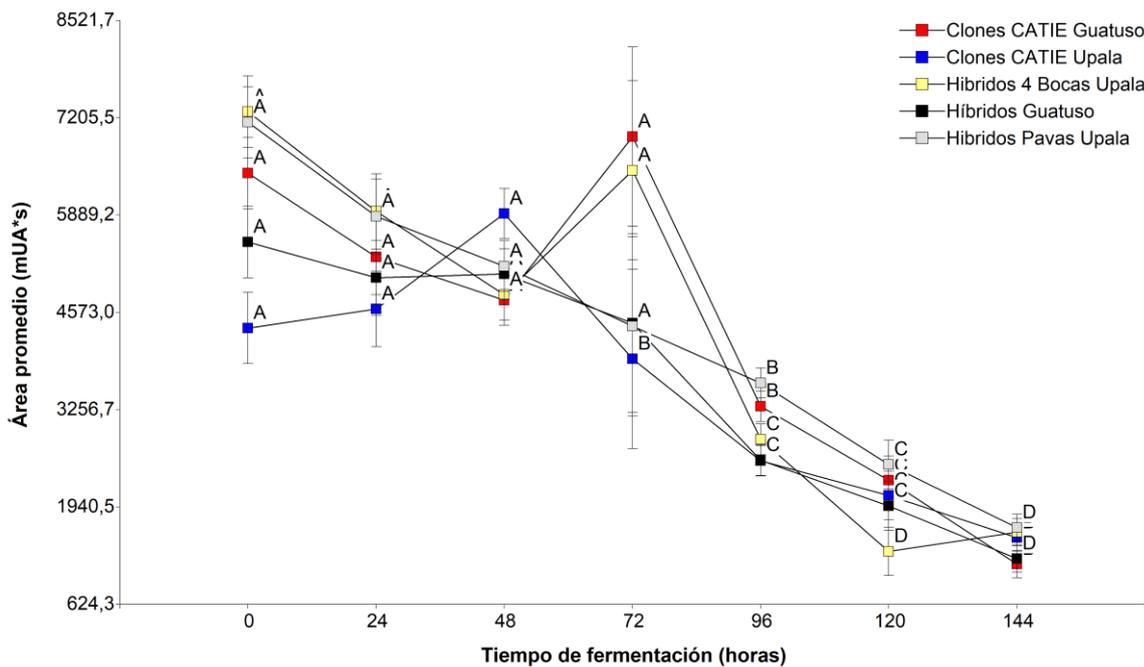


Figura 17. Gráfico del comportamiento de epicatequina (mUA*s) en grano de los cacaos comerciales durante la fermentación en función del tiempo. Medias con letra común no son diferentes estadísticamente ($p>0.05$).

Estudios por Elwers, Zambrano, Rohsius, & Lieberei, (2009) demostraron que la fertilización tiene un gran impacto en el contenido de fenólicos de los grupos genéticos Criollo, Forastero y Trinitario. Por otra parte, Carrillo, Londoño-Londoño, & Gil, (2014) exponen que la variedad de microclimas conduce a la producción de cacaos con alta variabilidad en su composición química. Dichos fenómenos se han observado también en otros productos alimenticios como el aceite de oliva, la miel y los aceites esenciales de pino, atribuyéndolo a las condiciones ambientales de cultivo (climáticas y edafológicas) (Baltrušaityte, Venskutonis, & Čeksteryte, 2007; Semiz, Heijari, Isik, & Holopainen, 2007; Temime, Campeol, Cioni, Daoud, & Zarrouk, 2006).

Los genotipos estudiados del CATIE así como los cacaos comerciales comparten un patrón de disminución similar en el contenido de epicatequina. Afoakwa, (2014) expone que, durante las fases aeróbicas, se producen reacciones mediadas por oxígeno, como la oxidación de los complejos de proteínas y polifenoles formados anaeróbicamente. Tal reducción de estos compuestos en el cotiledón, durante y después de la fermentación, ha sido reportado anteriormente por Elwers *et al.*, (2009); Forsyth & Quesnel (1957); Keeney & Kim (1984); Lee *et al.*, (2019). Además, Brunetto *et al.*, (2007) confirma que dicha disminución depende directamente del tiempo de reacción.

El comportamiento de teobromina en los grupos genéticos estudiados presentes en el CATIE (Nacional, Nanay, Iquitos y Marañón) (Fig. 12) presentaron pocos cambios significativos durante los primeros días de fermentación. Asimismo, a las 72 horas presentaron una disminución radical del 12.03%, cuyos valores se mantuvieron constantes hasta el último día de fermentación. Lambert & Aitken, (2000) explican que la alta permeabilidad de la testa de grano de cacao durante los primeros días de fermentación inhibe la reducción de los niveles de teobromina y cafeína en los granos fermentados. Esto debido a que la estructura del grano de cacao aún no se ve alterada, y la ausencia de alcaloides que puedan penetrar a través de la testa.

En el caso de los genotipos comerciales (Fig. 13), en teobromina sí se observaron diferencias significativas entre ellos y en función del tiempo de fermentación. Sin embargo, aunque todos presentaron diferentes cambios y disminuciones durante el tiempo de fermentación, todos los genotipos compartieron una disminución en el último día. Los clones CATIE Upala presentaron mayor cambio en el contenido de teobromina con un 21.81% de cambio, seguido por

los Híbridos Guatuso con un 7.12%, Híbridos Pavas Upala con 5.12% y, por último, con los menores cambios en el contenido de teobromina, se encontraron los Clones CATIE Guatuso y los Híbridos Cuatro Bocas de Upala con 2.66% y 1.10% respectivamente.

Estudios explican que descomposición de las barreras biológicas (membranas) entre el almacenamiento y las células de pigmentos dentro de los cotiledones del grano es un factor clave para la liberación de varias enzimas; y en deducción, la pérdida de compuestos presentes en el grano (Böle. Biehl, Wewetzer, & Passern, 1982; Böle Biehl et al., 1982). Esto explica que el rompimiento de membranas de las células almacenadoras de metilxantinas, no presentan las mismas transformaciones en los diferentes genotipos denominados comerciales. Sin embargo, hay que tomar en cuenta el contenido inicial según el genotipo. Puesto que los clones CATIE Upala datan mayores cantidades de teobromina, su disminución resultó ser mayor a los otros genotipos. No obstante, sin importar el contenido inicial, todos los genotipos comerciales interceptaron en el mismo contenido de teobromina al final de la fermentación (Fig. 13).

Los cambios de cafeína resultaron solo ser significativos a través del tiempo tanto en cacaos CATIE como los comerciales (Fig. 14 y 15). Para los cacaos del CATIE presentan 2.6 mg/g de cafeína inicial (0h), con una disminución a partir de las 24 h cuyo contenido se mantuvo constante estadísticamente, detectándose un contenido final a las 144 h de 1.9 mg/g, lo cual representó un 40% de cambio. Con respecto a los cacaos comerciales, se presentaron cambios similares de 38.7%, contenidos iniciales de 2.15 mg/g cafeína, con un descenso a partir de las 96h, cuya concentración final fue de 1.55 mg/g cafeína.

De igual manera, estudios por Brunetto *et al.*, (2007) registraron una ligera reducción en el contenido de teobromina y cafeína de acuerdo con los tiempos de fermentación. Disminución en el nivel de teobromina de 9.2 a 6.4 mg/g (30.4%), mientras que la disminución de cafeína fue de 1.5 a 0.83 mg/g (una disminución del 45%). Camu, Winter, *et al.*, (2008) también demostraron que las cantidades de teobromina disminuyen con respecto al tiempo de fermentación, con una pérdida total de teobromina hasta de un 20% después de 144 h de fermentación.

R. Schwan & Wheals, (2004a) concuerdan que tales cambios de teobromina y cafeína se debe a su difusión., así como a la pérdida en los exudados durante el proceso de fermentación (Lima *et al.*, 2011). Cabe mencionar que según Schwan & Wheals, (2004a) la

teobromina y la cafeína y sus complejos son componentes principales del sabor amargo del cacao y como resultado de su difusión se expresa una reducción significativa en la amargura y la astringencia (Camu, Winter, *et al.*, 2008). Sin embargo, grandes pérdidas de estos compuestos no son beneficiosas en la calidad nutricional del cacao, ya que tanto la teobromina como la cafeína son bien conocidos por sus efectos fisiológicos sobre el sistema nervioso central, cardiovascular, gastrointestinal, respiratorio y renal (Nehlig, 2013; Nehlig, Daval, & Debry, 1992; Spiller, 1998).

Como se mencionó, entre los grupos genéticos del CATIE no se presentaron diferencias significativas en contenido de epicatequina (Fig. 16). Estudios expuestos por (Elwers *et al.*, 2009) tampoco reportaron diferencias significativas en el contenido de polifenoles totales y (-)-epicatequina entre los cacaos Criollo, UAF, LAF, Nacional y Trinitario. Estos resultados también son apoyados por Graziani de Fariñas, Ortiz de Bertorelli, & Parra, (2003) quienes no encontraron diferencias significativas en el contenido individual de taninos entre cacaos Forasteros, Criollos y Trinitarios.

Los cacaos del CATIE se caracterizan por no presentar cambios en el contenido de epicatequina durante los primeros dos días de fermentación (Fig. 16). No obstante, a las 48h muestra un gran aumento seguidamente acompañado con una disminución gradual determinado a las 96 h. Tal comportamiento se mantiene constante hasta el final de la fermentación, concluyendo con un detrimento del 57.6%. Datos similares han sido obtenidos (con un 61.1-87.5% en el cambio final de epicatequina) por Camu, Winter, *et al.*, (2008) mediante fermentaciones apiladas en Ghana.

En el caso del comportamiento del contenido de epicatequina en los cacaos comerciales, estos sí presentaron diferencias significativas en la evolución de tal compuesto a través del tiempo y genotipo estudiado (Fig. 17). Lo anterior, se puede atribuir a los diferentes factores externos, no controlados en el presente estudio, tales como localidad, así como condiciones edáficas y climáticas diferentes características de cada lugar. Diferencias en el contenido de (-)-epicatequina atribuidas a la localidad geográfica del cultivo de cacao, han sido igualmente determinados por Caligiani, Cirlini, Palla, Ravaglia, & Arlorio (2007); Keeney & Kim (1984).

Las transformaciones bioquímicas a nivel de epicatequina presentaron cambios porcentuales al final de la fermentación mucho más altos a los grupos genéticos del CATIE. Los

clones CATIE de Upala presentan el menor cambio con un 65%, continuo por los Híbridos Pavas de Upala con un 76.75%, Híbridos Guatuso con 77.52% y, por último, sobresalen los Híbridos Cuatro Bocas de Upala y los Clones CATIE Guatuso e los cambios más considerables del contenido de epicatequina, con 78.02% y 81.93% respectivamente. Publicaciones reportan cambios porcentuales de epicatequina a través de la fermentación desde 10-20% (Bracco, Grailhe, & Egli, 1969; Hansen *et al.*, 1998; Keeney & Kim, 1984) así como pérdidas de más del 70% (Camu, Winter, et al., 2008).

Cabe mencionar que, aunque Clones CATIE Guatuso e Híbridos Cuatro Bocas de Upala presentaron el menor cambio de teobromina, son los que presentan mayor cambio en epicatequina. Por lo tanto, se podría atribuir que la poca pérdida de astringencia y acidez en función a la teobromina se puede complementar con la pérdida de epicatequina.

En todas las fermentaciones el contenido de epicatequina no presenta cambios en los primeros dos días de fermentación. Hansen *et al.*, (1998) justifican que las temperatura de 28–35°C presentes en los primeros días de fermentación anaeróbica (levadura) mantienen inactiva la polifenol oxidasa, responsable de la oxidación y condensación de los polifenoles durante la fermentación, así como su difusión fuera de los granos a través de los exudados, lo cual provoca la disminución de polifenoles en los granos de cacao. (Misnawi, Selamat Jinap, Saari Nazamid, 2002; Misnawi, Jinap, Jamilah, & Nazamid, 2003; Nazaruddin, Seng, Hassan, & Said, 2006; Wollgast & Anklam, 2000).

Por otra parte, Roelofsen (1958) mencionan que la difusión de los polifenoles de sus células de almacenamiento comienza con la muerte del cotiledón, que ocurre generalmente entre el segundo o tercer día de fermentación, ya que la temperatura óptima para la actividad de la polifenol oxidasa es de alrededor de 42–45°C (Misnawi, Selamat Jinap, Saari Nazamid, 2002). Tales condiciones corresponden con las presentadas en este estudio (96h con 48°C), por lo que se atribuye que la mayor pérdida de epicatequina tanto en los grupos genéticos del CATIE como en los cacaos comerciales se refleja al cuarto día de fermentación (Fig. 16 y 17). Estudios realizados por Camu, Winter, *et al.*, (2008) ejemplifican tal comportamiento con la fuerte disminución del contenido total de polifenoles, en particular con respecto a la epicatequina, entre el segundo y el cuarto día de fermentaciones apiladas en Ghana.

El estudio del comportamiento de epicatequina es de suma importancia durante la fermentación de cacao, incluso se usa como indicador del grado de fermentación, ya que como establecen Ferrão, (2002); Forsyth & Quesnel, (1963); Hansen *et al.*, (1998) la (-) - epicatequina es el sustrato principal para la polifenol oxidasa, lo que resulta en la producción de quinonas, compuestos muy reactivos, que pueden polimerizarse con otros polifenoles o formar complejos con aminoácidos y proteínas. Estos procesos tienen dos consecuencias importantes: la obtención del color marrón en los granos, y la formación de compuestos insolubles de alto peso molecular, que reducen la astringencia y el amargor de los granos. Por lo tanto, la epicatequina se puede usar como una medida del grado de oxidación de los compuestos fenólicos durante la fermentación y el secado (Kadow, Niemenak, Rohn, & Lieberei, 2015).

Es bien sabido que las epicatequinas tienen grandes propiedades nutritivas, tal y como menciona Schroeter *et al.*, (2006) la (-) -epicatequina se conoce como el compuesto más activo responsable de los beneficios para la salud vascular asociados al cacao y chocolate. Sin embargo, según lo mencionado, la pérdida de epicatequina es un factor clave como indicador de una buena fermentación debido a la pérdida de astringencia del grano. Incluso Keeney & Kim, (1984); Roelofsen, (1958) mencionan que desde hace tiempo atrás, se sabe que ocurren grandes pérdidas de flavanoles cuando los granos de cacao se fermentan. Asimismo, estudios realizados por Hurst *et al.*, (2011) confirman el impacto del grado de fermentación en el nivel de pérdida de (-)-epicatequina en granos de cacao.

Por otro lado, en ambas fermentaciones se encontraron compuestos distintivos asociados a la genética. Para los granos de los grupos genéticos del CATIE el contenido de epicatequina (Fig. 19) es significativo estadísticamente en relación con los grupos genéticos estudiados, mientras que en los cacaos comerciales, la cafeína resultó ser el compuesto distintivo estadísticamente según los genotipos (Fig. 18).

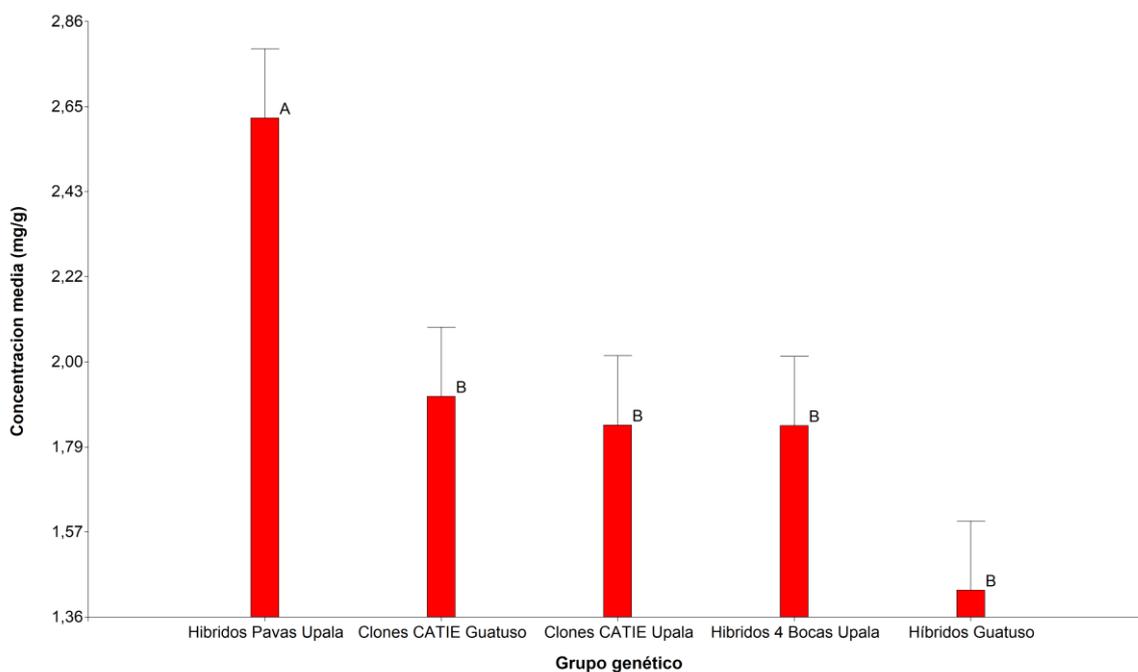


Figura 18. Gráfico del contenido promedio de cafeína (mg/g) en grano durante fermentación de cacaos comerciales, (medias con letra común no son diferentes estadísticamente ($p > 0.05$)).

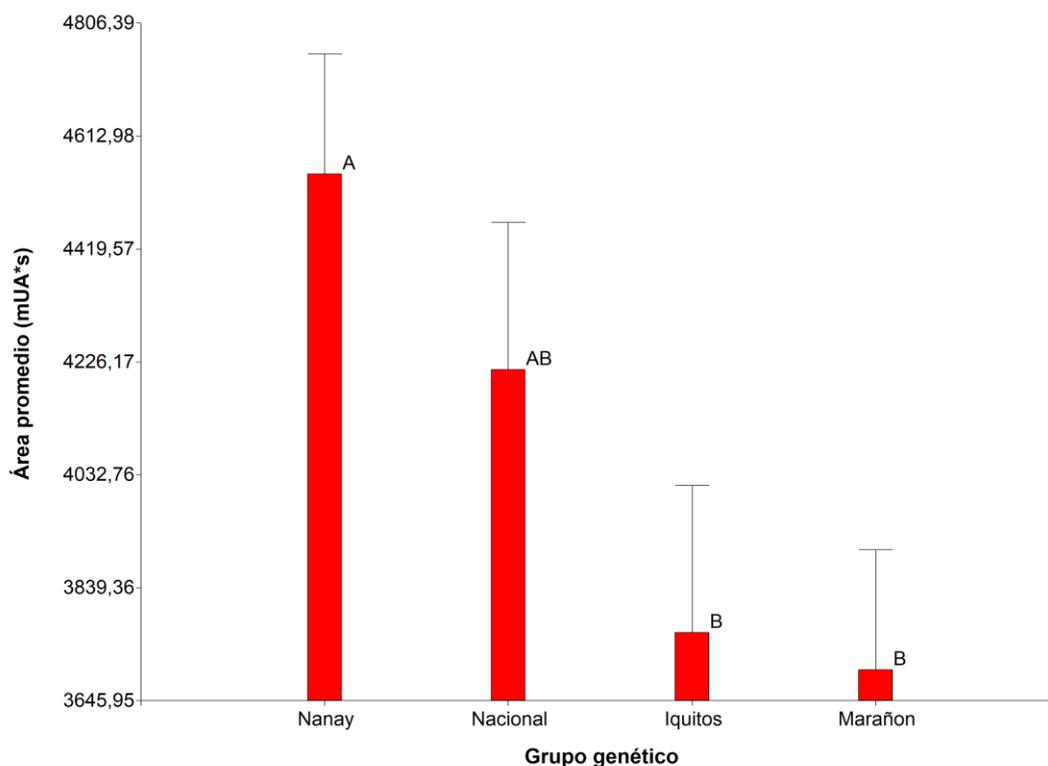


Figura 19. Gráfico del contenido promedio de epicatequina (mUA*s) en grano durante fermentación de los grupos genéticos del CATIE, (medias con letra común no son diferentes estadísticamente ($p > 0.05$)).

Tales resultados son de suma importancia, ya que ambos compuestos son precursores de sabor. Como fue mencionado, la epicatequina es un indicador importante en el grado de fermentación. Por lo tanto, se podría aludir que los cacaos pertenecientes al grupo Nanay requieren más tiempo de fermentación que los tipo Marañón. Incluso, bajo observaciones propias, se pudo observar que los granos de Marañón alcanzan condiciones adecuadas de fermentación (olor a alcohol y ácido acético y color café de la pulpa) con mayor rapidez que los tipo Nanay.

El comportamiento de epicatequina en todos los grupos genéticos a través del tiempo resultó no significativo. Por lo que, se deduce la fermentación como un ente estandarizador de tales compuestos en el grano. Estudios realizados por Kadow *et al.*, (2015) donde utilizaron una metodología similar de micro fermentación controlada, concluyeron que con el control del efecto del calor y la acidez se puede alcanzar una óptima fermentación. Por lo tanto, la aplicación de tal técnica puede permitir la estandarización y la mecanización de la fermentación del cacao.

En el caso de los cacaos comerciales, la cafeína en los híbridos Pavas Upala es significativamente mayor que las otras muestras (Fig. 18). La cafeína aunque no es un compuesto determinante en el grado de fermentación, está estrechamente asociado al genotipo. Estudios realizados por Carrillo *et al.*, (2014) indican que el contenido de cafeína y la relación teobromina/cafeína, podrían servir como parámetros para establecer una clasificación de granos de cacao de acuerdo con el área geográfica de las regiones productoras de cacao.

Asimismo la cafeína tiene gran peso en el sabor amargo, por ende, en la calidad sensorial del chocolate. Brunetto *et al.*, (2007) establece la importancia de analizar metilxantinas (teobromina, teofilina y cafeína), debido a que sus niveles dependen del genotipo y afectan el sabor de los granos de cacao. Sin embargo, los niveles de cafeína son relativamente bajos en cacao, en comparación con los que se encuentran en el café y el té (USDA (United States Department of Agriculture), 2008), con valores aproximados al 0.2% (Timbie, Sechrist, & Keeney, 1978). No obstante, este elemento podría ser determinante en el complejo del desarrollo de chocolates con calidades sensoriales y nutritivas diferenciales (mayor potencial estimulante).

5. CONCLUSIONES

Se concluye que la metodología de micro fermentación diseñada e implementada en esta investigación constituye una herramienta de utilidad y relevancia para la agroindustria del cacao. El método propuesto fue capaz de propiciar condiciones óptimas para la biotransformación de azúcares, etanol, ácido láctico y ácido acético en pulpa, así como de epicatequina y metilxantinas dentro de los granos, tal y como ocurren en la fermentación in situ del cacao. La literatura estudiada, y la comparación de resultados, evidenciaron que la metodología implementada permite el alcance de resultados similares a los reportados en estudios de fermentación a gran escala.

El sistema de fermentación planteada, muestra resultados adecuados sobre la dinámica y proceso de este estudio debido a que estandariza los comportamientos de las sucesiones microbiológicas, y por ende los cambios bioquímicos en los compuestos estudiados en pulpa (azúcares, etanol y ácidos orgánicos), así como dentro del grano. Tanto entre los grupos genéticos del CATIE como en los genotipos comerciales se presentó el mismo patrón a través del tiempo (diferencias no significativas) en el comportamiento de dichos componentes. Con respecto a los cambios bioquímicos dentro del grano, todos los grupos genéticos del CATIE presentan la misma tendencia en el comportamiento de metilxantinas y epicatequina, ya que no hubo diferencias significativas entre los grupos genéticos. Mientras que los cacaos comerciales, sí presentaron diferencias significativas en el comportamiento de los compuestos (exceptuando la cafeína), sin embargo, al final de la fermentación todos compartieron estadísticamente los mismos contenidos.

Aunque no se realizó un estudio microbiológico exhaustivo para complementar el análisis de las transformaciones de los compuestos estudiados en pulpa, se puede concluir que microorganismos inoculados (*H. opuntiae* y *Acetobacter spp.*) propiciaron fermentación óptima debido a la disminución de azúcares durante fermentación asociado a la producción de etanol y ácidos orgánicos, coincidiendo con fermentaciones en masa de cacao reportadas por la literatura.

Según los resultados del contenido promedio de los compuestos estudiados en grano durante fermentación, la epicatequina fue el compuesto distintivo entre los grupos genéticos del CATIE, resultando ser los cacaos tipo Marañón más fermentables (ocupan menos tiempo de fermentación) y los Nanay menos fermentables. Entre los cacaos comerciales fue la cafeína el compuesto que difiere entre los genotipos estudiados, siendo los cacaos Híbridos Pavas de Upala

con el mayor potencial estimulante por poseer el mayor contenido de cafeína en comparación con los otros genotipos.

Las variables controladas en esta fermentación (temperatura, aireación y microbiología) fueron claves para que las transformaciones bioquímicas se den de manera óptima, ya que los resultados del análisis de compuestos estudiados fueron estadísticamente significativos a medida que avanzaba la fermentación (tiempos de fermentación), los cuales concuerdan con los registrados en la literatura.

6. RECOMENDACIONES

Aunque no se encontraron diferencias significativas en la composición bioquímica de azúcares reductores, ácido láctico y acético, etanol entre los diferentes genotipos. Se recomienda el estudio más detallado y exhaustivo de compuestos volátiles en pulpa para la identificación bioquímica de precursores de sabor y propiedades organolépticas entre las genéticas estudiadas. Debido a que estudios en dos genotipos de cacao (SCA6 y EET62) realizados por Kadow, Bohlmann, Phillips, & Lieberei, (2013) muestra que la pulpa de la fruta de cacao puede tener grandes diferencias cuantitativas y cualitativas en la composición de los volátiles dependiendo del genotipo.

Se recomienda mejor asepsia durante el proceso de fermentación, así como estudios posteriores microbiológicos, con el fin de comprobar que el microorganismo de estudio sea el que prevalezca y exprese un mayor desarrollo dentro de las condiciones planteadas, debido que las transformaciones bioquímicas durante la fermentación están sumamente relacionadas a la actividad microbiológica.

Así como el estudio de esta misma metodología comparándola con una fermentación a escala in situ, con el fin de la comprobación de la utilidad de la herramienta incluso en fincas y con mayor cantidad de granos.

Estudiar detalladamente el efecto de las condiciones agroclimáticas, así como geográficas de las plantaciones de cacao en el contenido de polifenoles y metilxantinas de granos de cacao y su comportamiento durante fermentación.

Análisis de azúcares, ácidos orgánicos y etanol tanto en pulpa como dentro del grano para la comprobación del movimiento y contribución en el desencadenamiento de reacciones bioquímicas dentro del grano y por ende en el desarrollo de precursores de aroma y sabor durante la fermentación de cacao.

Análisis de pH dentro del grano, para confirmación del grado óptimo de fermentación, ya que es uno de lo más parámetros más usados en la industria de cacao como indicador de una buena fermentación.

Comprobación del método de detección y cuantificación de ácido acético en pulpa, ya que en algunas investigaciones utilizan cromatografía de gases u otros métodos de cromatografía líquida.

Se recomienda inocular la *Acetobacter* spp. a las 72 h, ya que a ese tiempo se detectaron las máximas concentraciones de etanol, lo que favorece el desarrollo de la AAB, para la producción de mayores cantidades de ácido acético en pulpa, recomendadas y reportadas en la literatura (20 mg/g en fermentaciones de cacao en masa).

6. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aculey, P. C., Snitkjaer, P., Owusu, M., Bassompierre, M., Takrama, J., Nørgaard, L., ... Nielsen, D. S. (2010). Ghanaian cocoa bean fermentation characterized by spectroscopic and chromatographic methods and chemometrics. *Journal of Food Science*, 75(6), 300–307. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2010.01710.x>
- Afoakwa, E. O. (2010). *Chocolate science and technology*. Oxford, UK: Wiley-Blackwell Publishers.
- Afoakwa, E. O. (2014). Changes during Fermentation of Cocoa Beans. *Cocoa Production and Processing Technology*, 121–137. https://doi.org/BOOK_DOI_10.1201/b16546
- 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.
- Afoakwa, E. O., Quao, J., Takrama, J., Budu, A. S., & 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.
- Aikpokpodion, P. O. (2010). Variation in agro-morphological characteristics of cacao, *Theobroma cacao* L., in farmers' fields in Nigeria. *New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science*, 38(2), 157–170. <https://doi.org/10.1080/0028825X.2010.488786>
- Álvarez, C. (2008). *Caracterización y tipificación de los parámetros físicos, químicos, físico-químicos y componentes del sabor y aroma de una población de cacao criollo híbrido (Theobroma cacao L.) de Venezuela*. Universidad Central de Venezuela. Ca.
- Amores, F., Buttler, D., Ramos, G., Skuha, D., Espín, S., Gómez, A., ... Seguíne, E. (2007). *Project to establish the physical, chemical and organoleptic parameters to differentiate between fine or flavor and bulk cocoa*. Quevedo, Ecuador.
- Ardhana, M. M., & Fleet, G. H. (2003). The microbial ecology of cocoa bean fermentations in Indonesia. *International Journal of Food Microbiology*, (86), 87–99. [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(03\)00081-3](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(03)00081-3)
- Astorga, C. G. (1999). *Caracterización de variedades cultivadas de café (Coffea arabica L.) conservadas en el banco de germoplasma del CATIE*. Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza (CATIE).
- Baltrušaityte, V., Venskutonis, P. R., & Čeksteryte, V. (2007). Radical scavenging activity of different floral origin honey and beebread phenolic extracts. *Food Chemistry*, 101(2), 502–

514. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2006.02.007>

- Barel, M. (1998). Cacao et Chocolat. In P. J. (Ed.), *Première transformation du cacao* (pp. 95–116). Paris, France: Sciences et Techniques agroalimentaires, Lavoisier.
- Bartley, B. G. (2005). *The genetic diversity of cacao and its utilization*. London, UK: Cabi.
- Batista, N. N., Ramos, C. L., Ribeiro, D. D., Pinheiro, A. C. M., & Schwan, R. F. (2015). Dynamic behavior of *Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia kluyveri* and *Hanseniaspora uvarum* during spontaneous and inoculated cocoa fermentations and their effect on sensory characteristics of chocolate. *LWT - Food Science and Technology*, 63(1), 221–227. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2015.03.051>
- Belscak, A., Komes, D., Horzic, D., Ganic, K. K., & Karlovic, D. (2009). Comparative study of commercially available cocoa products in terms of their bioactive composition. *Food Research International*, 42(5–6), 707–716.
- Bertazzo, A., Comai, S., Brunato, I., Zancato, M., & Costa, C. V. L. (2011). The content of protein and non-protein (free and protein-bound) tryptophan in *Theobroma cacao* beans. *Food Chemistry*, 124, 93–96.
- Biehl, B., Brunner, E., Passern, D., Quesnel, V., & Adomako, D. (1985). Acidification, proteolysis and flavour potential in fermenting cocoa beans. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 36(7), 583–598. <https://doi.org/10.1002/jsfa.2740360710>
- Biehl, B., Heinrichs, H., Ziegleder, B., Srivastava, S., Xiong, Q., Passern, V., ... HAMMOOR, M. (1993). The proteases of ungerminated cocoa seeds and their role in the fermentation process. *Angewandte Botanik*, 67(1–2), 59–65.
- Biehl, B., Passern, D., & Sagemann, W. (1982). Effect of acetic acid on subcellular structures of cocoa bean cotyledons. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 33(11), 1101–1109. <https://doi.org/10.1002/jsfa.2740331107>
- Biehl, B., Wewetzer, C., & Passern, D. (1982). Vacuolar (Storage) Proteins of Cocoa Seeds and their Degradation during Germination and Fermentation. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 33(12), 1291–1304. <https://doi.org/10.1002/jsfa.2740331216>
- Biehl, B., & Ziegleder, G. (2003). *Cocoa: Chemistry of processing* (2nd ed.). Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition.
- Bonvehí, J. S. (2005). Investigation of aromatic compounds in roasted cocoa powder. *European Food Research and Technology*, 221(1–2), 19–29. <https://doi.org/10.1007/s00217-005-1147-y>
- Bovo, B., Andrighetto, C., Carlot, M., Corich, V., Lombardi, A., & Giacomini, A. (2009). Yeast

- population dynamics during pilot-scale storage of grape marcs for the production of Grappa, a traditional Italian alcoholic beverage. *International Journal of Food Microbiology*, 129(3), 221–228. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2008.11.025>
- Bracco, U., Grailhe, N., & Egli, R. H. (1969). Cocoa Curing in the Ivory Coast. *J. Sci. Fd Agric.*, 20.
- Broach, J. R. (n.d.). Nutritional Control of Growth and Development in Yeast. <https://doi.org/10.1534/genetics.111.135731>
- Brunetto, R., Gutie, L., Ramos, G., Romero, C., Zambrano, A., & Go, A. (2007). Determination of theobromine, theophylline and caffeine in cocoa samples by a high-performance liquid chromatographic method with on-line sample cleanup in a switching-column system. *Food Chemistry*, 100, 459–467. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2005.10.007>
- Bucheli, P., Rousseau, G., Alvarez, M., Laloi, M., & McCarthy, J. (2001). Developmental Variation of Sugars, Carboxylic Acids, Purine Alkaloids, Fatty Acids, and Endoproteinase Activity during Maturation of *Theobroma cacao* L. Seeds. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, (49), 5046–5051.
- Cadez, N., Raspor, P., & Smith, M. T. (2006). Phylogenetic placement of *Hanseniaspora-Kloeckera* species using multigene sequence analysis with taxonomic implications: Descriptions of *Hanseniaspora pseudoguilliermondii* sp. nov. and *Hanseniaspora occidentalis* var. *citrica* var. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 56(5), 1157–1165. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.64052-0>
- Caligiani, A., Cirlini, M., Palla, G., Ravaglia, R., & Arlorio, M. (2007). GC-MS Detection of Chiral Markers in Cocoa Beans of Different Quality and Geographic Origin. *Chirality*, (19), 329–334. <https://doi.org/10.1002/chir>
- Camu, N., De Winter, T., Verbrugge, K., Cleenwerck, I., Vandamme, P., Takrama, J. S., ... De Vuyst, L. (2007). Dynamics and biodiversity of populations of lactic acid bacteria and acetic acid bacteria involved in spontaneous heap fermentation of cocoa beans in Ghana. *Applied and Environmental Microbiology*, 73(6), 1809–1824. <https://doi.org/10.1128/AEM.02189-06>
- Camu, N., González, Á., De Winter, T., Van Schoor, A., De Bruyne, K., Vandamme, P., ... De Vuyst, L. (2008). Influence of turning and environmental contamination on the dynamics of populations of lactic acid and acetic acid bacteria involved in spontaneous cocoa bean heap fermentation in Ghana. *Applied and Environmental Microbiology*, 74(1), 86–98. <https://doi.org/10.1128/AEM.01512-07>

- Camu, N., Winter, T. De, Addo, S. K., Takrama, J. S., Bernaert, H., & Vuyst, L. De. (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), 2228–2297. <https://doi.org/10.1002/jsfa>
- Carr, J. G., Davis, P. A., & Dougan, J. (1979). *Cocoa fermentation in Ghana and Malaysia*. Chatham, United Kingdom: Natural Resources Institute.
- Carrillo, L. C., Londoño-Londoño, J., & Gil, A. (2014). Comparison of polyphenol, methylxanthines and antioxidant activity in Theobroma cacao beans from different cocoa-growing areas in Colombia. *Food Research International*, 60, 273–280.
- Carrillo, L. C., Londoño-Londoño, J., & Gil, A. (2014). Comparison of polyphenol, methylxanthines and antioxidant activity in Theobroma cacao beans from different cocoa-growing areas in Colombia. *Food Research International*, 60, 273–280. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2013.06.019>
- Centro de Comercio Internacional (CCI). (1991). *Resumen para los servicios de Información comercial. Cacao fino o de de aroma. Estudio de la producción y el comercio mundiales*.
- Chandler, J. A., Eisen, J. A., & Kopp, A. (2012). Yeast communities of diverse Drosophila species: Comparison of two symbiont groups in the same hosts. *Applied and Environmental Microbiology*, 78(20), 7327–7336. <https://doi.org/10.1128/AEM.01741-12>
- Chanprasartsuk, O., Prakitchaiwattana, C., & Sanguandeeikul, R. (2013). Comparison of methods for identification of yeasts isolated during spontaneous fermentation of freshly crushed pineapple juices. *Journal of Agricultural Science and Technology*, 15(SUPPL), 1479–1490.
- Clapperton, J. (1992). *Assessment of cocoa flavor and fat content. International Workshop on Conservation, Characterization and Utilization of Cocoa Genetic Resources in the 20th Century September 13th-17th. The Cocoa Research Unit*. Trinidad and Tobago.
- Clapperton, J., Yow, S., Chan, J., Lim, D., Lockwood, R., Romanczyk, L., & Hammerstone, J. (1994). The contribution of genotype to cocoa (Theobroma cacao L.). *Tropical Agriculture (Trinidad)*, 71, 303–308.
- Contreras, C., Bertorelli, L. O. de, Fariñas, L. G. de, & Parra., P. (2002). Fermentadores para cacao usados por los productores de la localidad de Cumboto, Venezuela. *Agronomía Tropical*, 54(2), 219–232.
- Counet, C., Ouwerx, C., Rosoux, D., & Collin, S. (2004). Relationship between procyanidin and flavor contents of cocoa liquors from different origins. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 52, 6243–6249.

- 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. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2013.06.024>
- Cros, E., & Jeanjean, J. (1995). Cocoa quality: Effect of fermentation and drying. *Plantations Reach Development*, (5), 25–27.
- Cuatrecasas, J. (1964). Cacao and its allies. A taxonomic revision of the genus *Theobroma*. *The Contributions from the United States National Herbarium*, *35*(6), 379–605.
- Daniel, H. M., & Meyer, W. (2003). Evaluation of ribosomal RNA and actin gene sequences for the identification of ascomycetous yeasts. *International Journal of Food Microbiology*, *86*(1–2), 61–78. [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(03\)00248-4](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(03)00248-4)
- Davrieux, F., Assemat, S., Boulanger, R., & Cros, E. (2004). Determination of cocoa purine content by near infrared spectroscopy. Retrieved from https://agritrop.cirad.fr/515867/1/document_515867.pdf
- de Brito, E. S., Garcia, N. H. P., Gallao, M. I., Cortelazzo, A. L., Fevereiro, P. S., & Braga, M. R. (2001). Structural and chemical changes in cocoa (*Theobroma cacao* L) during fermentation, drying and roasting. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, *81*(2), 281–288. [https://doi.org/Doi.10.1002/1097-0010\(20010115\)81:2<281::Aid-Jsfa808>3.0.Co;2-B](https://doi.org/Doi.10.1002/1097-0010(20010115)81:2<281::Aid-Jsfa808>3.0.Co;2-B)
- De Ley, J., Gillis, M., & Swings, J. (1984). Family VI. Aceto- bacteraceae. In R. Krieg & J. G. Holt (Eds.), *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* (Vol.1, pp. 267–278). Williams & Wilkins.
- de Melo Pereira, G. V., Soccol, V. T., Pandey, A., Medeiros, A. B. P., Andrade Lara, J. M. R., Gollo, A. L., & Soccol, C. R. (2014). Isolation, selection and evaluation of yeasts for use in fermentation of coffee beans by the wet process. *International Journal of Food Microbiology*, *188*, 60–66. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2014.07.008>
- de Muijnck, L. (2005). *Cocoa. Encapsulated and powdered foods*. New York, USA: CRC Press.
- De Vuyst, L., & Weckx, S. (2010). The functional role of lactic acid bacteria in cocoa bean fermentation. *Biotechnology of Lactic Acid Bacteria: Novel Applications*, 301–326.
- Dongo, L., Aigbekaen, E., Jayeola, C., Emaku, L., & Orisajo, S. (2009). Influence of farmers practices on cocoa bean quality: Nigeria field experience. *African Crop Science Conference Proceedings*, *9*, 299–302.
- Doran, J. W., & Parkin, T. B. (1994). Defining and assessing soil quality. *Defining Soil Quality*

for a Sustainable Environment, definingso, 1–21.

- Elwers, S., Zambrano, A., Rohsius, C., & Lieberei, R. (2009). Differences between the content of phenolic compounds in Criollo, Forastero and Trinitario cocoa seed (*Theobroma cacao* L.). *European Food Research and Technology*, 229(6), 937–948.
<https://doi.org/10.1007/s00217-009-1132-y>
- Enríquez, G. A. (2004). *Cacao Orgánico: Guía para productores ecuatorianos. Manual 54*. Quito, Ecuador: Instituto Nacional Autónomo de Investigaciones Agropecuarias.
- Eskes, B., & Lanaud, C. (2001). Cocoa. In S. Charrier, A. Jacquot, M. Hamon (Ed.), *Tropical Plant Breeding* (pp. 78–105). France: CIRAD.
- Espín, S. (2006). *Evaluación de parámetros químicos volátiles y no volátiles asociados a la calidad del cacao: Informe final Ecuador, Componente II, Proyecto CFC/ICCO/INIAP: Project to establish the physical, chemical and organoleptic parameters to differentiate between fin*. Quito, Ecuador.
- Facco, L. N., Paula, M. D. E., Has, M., & Grossa, P. (2016). *Caracterização morfológica e fisiológica de leveduras submetidas a preservação prolongada*. Paraná, Brasil.
- Fernández Maura, Y., Balzarini, T., Clapé Borges, P., Evrard, P., De Vuyst, L., & Daniel, H. M. (2016). The environmental and intrinsic yeast diversity of Cuban cocoa bean heap fermentations. *International Journal of Food Microbiology*, 233, 34–43.
<https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2016.06.012>
- Ferrão, J. E. M. (2002). *Cacau: tecnologia pós-colheita*. Lisboa, Portugal: Instituto de Cooperação Portuguesa- Ministério da Agricultura, do Desenvolvimento Rural e das Pescas.
- Figueira, A., Lambert, S., Carpenter, D., Pires, J. L., Cascardo, J., & Romanczyk, L. (1997). The similarity of cocoa flavour of fermented seeds from fingerprinted genotypes of *Theobroma cacao* L. from Brazil and Malaysia. *Tropical Agriculture (Trinidad)*, 74(2), 132–129.
- Fito, P., Lemaguer, M., & Betoret, N. (2007). Advanced food process engineering to model real foods and processes: “The SAFES” methodology. *Journal of Food Engineering*, 83, 173–185.
- Forsyth, W., & Quesnel, V. (1957). Variations in cocoa preparation. In *Sixth Meeting InterAmerican Cacao Committee, Bahia, Brazil*. (p. 157).
- Forsyth, W., & Quesnel, V. (1963). The mechanism of cacao curing. *Advances in Enzymology and Related Areas of Molecular Biology*, (25), 457–492.
- Fowler, M. S. (1999). Cocoa beans: From tree to factory. In S. T. Beckett (Ed.), *Industrial*

chocolate manufacture and use (3rd ed., pp. 8–35). Oxford: Blackwell Science.

- Frauentorfer, F., & Schieberle, P. (2006). Identification of the key aroma compounds in cocoa powder based on molecular sensory correlations. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *54*(15), 5521–5529. <https://doi.org/10.1021/jf060728k>
- French, E., & Hebert, T. (1982). *Métodos de investigación fitopatológica* (1 ed.). San José, Costa Rica.: Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura (IICA).
- García, L. F. (2008). Estudio de caracterización del potencial genético del cacao en Perú. Retrieved from http://www.censalud.ues.edu.sv/CDOC-Deployment/documentos/estudio_potencial_genetico.pdf
- Garofalo, C., Russo, P., Beneduce, L., Massa, S., Spano, G., & Capozzi, V. (2016). Non-Saccharomyces biodiversity in wine and the ‘microbial terroir’: a survey on Nero di Troia wine from the Apulian region, Italy. *Annals of Microbiology*, *66*(1), 143–150. <https://doi.org/10.1007/s13213-015-1090-5>
- Gilbert, D. (1980). Dispersal of yeasts and bacteria by *Drosophila* in a temperate forest. *Oecologia*, *(46)*, 135–137.
- Graziani de Fariñas, L., Ortiz de Bertorelli, L., & Parra, P. (2003). Características químicas de la semilla de diferentes tipos de cacao de la localidad de Cumboto, Aragua. *Agronomía Tropical*, *53*(2), 133–144.
- Guillamo, M., Ruiz, A., Poblet, M., & Mas, A. (2000). Identification of acetic acid bacteria by RFLP of PCR-amplified 16S rDNA and 16S – 23S rDNA intergenic spacer. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, *50*, 1981–1987.
- Hansen, C. E., Del Olmo, M., & Burri, C. (1998). Enzyme activities in cocoa beans during fermentation. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, *77*(2), 273–281. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0010\(199806\)77:2<273::AID-JSFA40>3.0.CO;2-M](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0010(199806)77:2<273::AID-JSFA40>3.0.CO;2-M)
- Heide-Marie, D., 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*, 774–783. <https://doi.org/10.1111/j.1567-1364.2009.00520.x>
- Hernández, C., Viera, I., María, M. A., Fernández, J., & Rodríguez, G. (2018). Bioactive compounds in Mexican genotypes of cocoa cotyledon and husk. *Food Chemistry*, *240*, 831–839. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.08.018>
- Ho, V. T. T., Zhao, J., & Fleet, G. (2015a). The effect of lactic acid bacteria on cocoa bean fermentation. *International Journal of Food Microbiology*, *205*, 54–67. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2015.03.031>

- Ho, V. T. T., Zhao, J., & Fleet, G. (2015b). The effect of lactic acid bacteria on cocoa bean fermentation. *International Journal of Food Microbiology*, 205, 54–67.
<https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2015.03.031>
- Hurst, W. J., Krake, S. H., Bergmeier, S. C., Payne, M. J., Miller, K. B., & Stuart, D. A. (2011). Impact of fermentation, drying, roasting and Dutch processing on flavan-3-ol stereochemistry in cacao beans and cocoa ingredients. *Chemistry Central Journal*, 5(1), 1–8. <https://doi.org/10.1186/1752-153X-5-53>
- International Cocoa Organization (IICO). (2012). Annual report for 2011/2012. Berners Street. Retrieved from <http://www.icco.org/about/anualreport.aspx>
- International Cocoa Organization (IICO). (2015). Growing cocoa. Retrieved from <http://www.icco.org/about-cocoa/growing-cocoa.html>
- Jalil, A. M. M., & Ismail, A. (2008). Polyphenols in cocoa and cocoa products: Is there a link between antioxidant properties and health? *Molecules*, 13(9), 2190–2219.
<https://doi.org/10.3390/molecules13092190>
- Jinap, S. (1994). Organic acids in cocoa beans. *Food Journal*, (9), 3–12.
- Kadow, D., Bohlmann, J., Phillips, W., & Lieberei, R. (2013). Identification of main fine or flavour components in two genotypes of the cocoa tree (*Theobroma cacao* L.), 98, 90–98.
<https://doi.org/10.5073/JABFQ.2013.086.013>
- Kadow, D., Niemenak, N., Rohn, S., & Lieberei, R. (2015). Fermentation-like incubation of cocoa seeds (*Theobroma cacao* L.) - Reconstruction and guidance of the fermentation process. *LWT - Food Science and Technology*, 62(1), 357–361.
<https://doi.org/10.1016/j.lwt.2015.01.015>
- Keeney, P. G., & Kim, H. (1984). (-)-Epicatechin Content in Fermented and Unfermented, 49, 1090–1092.
- Kongor, J. E., Hinneh, M., de Walle, D. Van, Afoakwa, E. O., Boeckx, P., & Dewettinck, K. (2016). Factors influencing quality variation in cocoa (*Theobroma cacao*) bean flavour profile - A review. *Food Research International*, 82, 44–52.
<https://doi.org/10.1016/j.foodres.2016.01.012>
- Kurtzman, C. P. (2011). *Pichia* E.C. Hansen (1904). In *The Yeasts* (5th ed., pp. 685–707). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-52149-1.00057-4>
- Lachance, M.-A. (2011). *Kluyveromyces* van der Walt (1971). In *The Yeasts* (5th ed., pp. 471–481). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-52149-1.00035-5>
- Lagunes Gálvez, S., Loiseau, G., Paredes, J. L., Barel, M., & Guiraud, J. P. (2007). Study on the

- microflora and biochemistry of cocoa fermentation in the Dominican Republic. *International Journal of Food Microbiology*, 114(1), 124–130.
<https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2006.10.041>
- Lam, S., & Howell, K. (2015). *Drosophila-associated yeast species in vineyard ecosystems*. *FEMS*. <https://doi.org/10.3122/jabfm.19.5.526>
- Lambert, S. V., & Aitken, W. M. (2000). Possible influence of cocoa bean testa characteristics on the flavour quality of fermented cocoa beans. In *13th international cocoa research conference, October 9–14*.
- Lanaud, C., Fouet, O., Clément, D., Boccara, M., Risterucci, A., Surujdeo, S., ... Argout, X. (2009). A meta-QTL analysis of disease resistance traits of *Theobroma cacao* L. *Molecular Breeding*, 24, 361–374.
- Leal, G. A., Gomes, L. H., Efraim, P., De Almeida Tavares, F. C., & Figueira, A. (2008). Fermentation of cacao (*Theobroma cacao* L.) seeds with a hybrid *Kluyveromyces marxianus* strain improved product quality attributes. *FEMS Yeast Research*, 8(5), 788–798.
<https://doi.org/10.1111/j.1567-1364.2008.00405.x>
- Lee, A. H., Neilson, A. P., O’Keefe, S. F., Ogejo, J. A., Huang, H., Ponder, M., ... Stewart, A. C. (2019). A laboratory-scale model cocoa fermentation using dried, unfermented beans and artificial pulp can simulate the microbial and chemical changes of on-farm cocoa fermentation. *European Food Research and Technology*, 245(2), 511–519.
<https://doi.org/10.1007/s00217-018-3171-8>
- Lefeber, T., Gobert, W., Vrancken, G., Camu, N., & De Vuyst, L. (2011). Dynamics and species diversity of communities of lactic acid bacteria and acetic acid bacteria during spontaneous cocoa bean fermentation in vessels. *Food Microbiology*, 28(3), 457–464.
<https://doi.org/10.1016/j.fm.2010.10.010>
- Lefeber, T., Janssens, M., Moens, F., Gobert, W., & De Vuyst, L. (2011). Interesting starter culture strains for controlled cocoa bean fermentation revealed by simulated cocoa pulp fermentations of cocoa-specific lactic acid bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 77(18), 6694–6698. <https://doi.org/10.1128/AEM.00594-11>
- Lefeber, T., Papalexandratou, Z., Gobert, W., Camu, N., & De Vuyst, L. (2012). On-farm implementation of a starter culture for improved cocoa bean fermentation and its influence on the flavour of chocolates produced thereof. *Food Microbiology*, 30, 379–392.
<https://doi.org/10.1016/j.fm.2011.12.021>
- Lehrian, D. W., & Patterson, G. R. (1984). Cocoa fermentation. *Biotechnology*, 5, 529–575.

- Li, Y., Feng, Y., Zhu, S., Luo, C., Ma, J., & Zhong, F. (2012). The effect of alkalization on the bioactive and flavor related components in commercial cocoa powder. *Journal of Food Composition and Analysis*, 25(17–23).
- Lima, L. J., 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. Retrieved from <http://dx.doi.org/10.1080/10408391003799913>.
- Lockwood, G., & Eskes, A. (1995). Relation entre la variete de cacoayer et la qualité” en Rencontres du Cacao le differents aspects de la qualité. Actes de Seminaire Montpellier. Francia. quality. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 44(4), 205–221.
- 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. <https://doi.org/10.1021/jf0116597>
- Markow, T. A., & O’Grady, P. (2008). Reproductive ecology of Drosophila. *Functional Ecology*, 22(5), 747–759. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2435.2008.01457.x>
- Martinez, J. (2007). *Caracterización morfológica y molecular del Cacao Nacional Boliviano y de selecciones élites del Alto Beni , Bolivia .* CATIE, Turrialba, Costa Rica.
- Mejía, L., & Arguello, O. (2000). *Fermentación y secado de los granos de cacao, Tecnología para el mejoramiento del sistema de producción de cacao.* (C. Impresiones Colombianos.Bucaramanga, Ed.). CORPOICA Ministerio de Agricultura.
- Misnawi, Selamat Jinap, Saari Nazamid, B. J. (2002). Activation of remaining key enzymes in dried under-fermented cocoa beans and its effect on aroma precursor formation. *Food Chemistry*, 78, 407–417.
- 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. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2621.2003.00674.x>
- Moncalvo, J. M., Lutzoni, F. M., Rehner, S. A., Johnson, J., & Vilgalys, R. (2000). Phylogenetic relationships of agaric fungi based on nuclear large subunit ribosomal DNA sequences. *Systematic Biology*, 49(2), 278–305. <https://doi.org/10.1093/sysbio/49.2.278>
- 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. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2013.06.001>

Moreno, J., & Sánchez, J. (1989). *Beneficios de cacao tecnología y desarrollo*. Fundación Hondureña de Investigación Agrícola.

Motamayor, C., Lachenaud, P., Loor, R., Kuhn, N. D., Brown, J. S., & Schnell, R. J. (2008). Geographic and genetic population differentiation of the amazonian chocolate tree (*Theobroma cacao* L). *PLOS ONE*, 3(10), 3311. Retrieved from <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0003311>

Motamayor, J. . (2001). *Etude de la diversité génétique et de la domestication des cacaoyers du groupe criollo (Theobroma cacao L.) à l'aide de marqueurs moléculaires*. Université Paris-Sud.

N’Goran, J. A., Laurent, V., Risterucci, A. M., & Lanaud, C. (1994). Comparative genetic diversity studies of *Theobroma cacao* L. using RFLP and RAPD markers. *Heredity*, 73(6), 589–597.

Navia, A., & Pazmiño, V. (2012). “*Mejoramiento de las Características Sensoriales del Cacao CCN51 a través de la Adición de Enzimas durante el Proceso de Fermentación*.” Escuela Superior Politécnica del Litoral.

Nazaruddin, R., Seng, L. K., Hassan, O., & Said, M. (2006). Effect of pulp preconditioning on the content of polyphenols in cocoa beans (*Theobroma Cacao*) during fermentation. *Industrial Crops and Products*, 24(1), 87–94. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2006.03.013>

Nehlig, A. (2013). The neuroprotective effects of cocoa flavanol and its influence on cognitive performance. *British Journal of Clinical Pharmacology*, 75(3), 716–727. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2125.2012.04378.x>

Nehlig, A., Daval, J. L., & Debry, G. (1992). Caffeine and the central nervous system: mechanisms of action, biochemical, metabolic and psychostimulant effects. *Brain Research Reviews*, 17(2), 139–170. [https://doi.org/10.1016/0165-0173\(92\)90012-B](https://doi.org/10.1016/0165-0173(92)90012-B)

Nicholas Camu, Tom De Winter, Solomon K Addo, Jemmy S Takrama, H. B. and L. D. V. (2008). Fermentation of cocoa beans: influence of microbial activities and polyphenol concentrations on the flavour of chocolate. *Society*, 823(October 2007), 819–823. <https://doi.org/10.1002/jsfa>

Nielsen, D. S., Teniola, O. D., Ban-Koffi, L., Owusu, M., Andersson, T. S., & Holzapfel, W. H. (2007). The microbiology of Ghanaian cocoa fermentations analysed using culture-dependent and culture-independent methods. *International Journal of Food Microbiology*, 114(2), 168–186. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2006.09.010>

- Niemenak, N., Rohsius, C., Elwers, S., Omokolo Ndoumou, D., & Lieberei, R. (2006). Comparative study of different cocoa (*Theobroma cacao* L.) clones in terms of their phenolics and anthocyanins contents. *Journal of Food Composition and Analysis*, *19*(6–7), 612–619. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2005.02.006>
- Oberthür, T., Läderach, P., Posada, H., Fisher, M. J., Samper, L. F., Illera, J., ... Jarvis, A. (2011). Regional relationships between inherent coffee quality and growing environment for denomination of origin labels in Nariño and Cauca, Colombia. *Food Policy*, *36*(6), 783–794. <https://doi.org/10.1016/j.foodpol.2011.07.005>
- Ortiz de Bertorelli, L., Graziani de Fariñas, L., & Gervaise, L. (2009). Influencia de varios factores sobre características del grano de cacao fermentado y secado al sol. *Agronomía Tropical*, *59*(2), 119–127.
- Othman, A., Ismail, A., Ghani, N. A., & Adenan, I. (2007). Antioxidant capacity and phenolic content of cocoa beans. *Food Chemistry*, *100*(4), 1523–1530.
- Palanca, L., Gaskett, A. C., Günther, C. S., Newcomb, R. D., & Goddard, M. R. (2013). Quantifying Variation in the Ability of Yeasts to Attract *Drosophila melanogaster*. *PLoS ONE*, *8*(9), 1–10. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0075332>
- Papalexandratou, Z., Lefeber, T., Bahrim, B., Lee, O. S., Daniel, H. M., & De Vuyst, L. (2013). *Hanseniaspora opuntiae*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Lactobacillus fermentum*, and *Acetobacter pasteurianus* predominate during well-performed Malaysian cocoa bean box fermentations, underlining the importance of these microbial species for a successful cocoa . *Food Microbiology*, *35*(2), 73–85. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2013.02.015>
- Papalexandratou, Z., Vrancken, G., de Bruyne, K., Vandamme, P., & de Vuyst, L. (2011). Spontaneous organic cocoa bean box fermentations in Brazil are characterized by a restricted species diversity of lactic acid bacteria and acetic acid bacteria. *Food Microbiology*, *28*(7), 1326–1338. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2011.06.003>
- Passos, F. M. L., & Passos, J. V. (1985). Descrição e classificação de bactérias acéticas isoladas da fermentação do cacau, com base em uma análise numérica. *Rev. Microbiol*, *16*, 290–298.
- Perea, J., Ramírez, O., & Villamizar, A. (2010). Caracterización fisicoquímica de materiales regionales de cacao colombiano. *Revista Biotecnología En El Sector Agropecuario y Agroindustrial*, *9*(1), 35–42. Retrieved from http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1692-35612011000100005
- 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. <https://doi.org/10.1128/AEM.01144-12>
- Ploetz, R. (2007). Cacao diseases: important threats to chocolate production worldwide. *Phytopathology*, 97, 1634–1647.
- Powis, T., Cyphers, A., Gaikwad, N., Grivetti, L., & Cheong, K. (2011). Cacao use and the San Lorenzo Olmec. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States*, 108(21), 8595–8600.
- Quesnel, V. C. (1965). Agents inducing the death of cacao seeds during fermentation. *J. Sci. Food Agric.*, 16, 441–447.
- Quiroz, V. (2002). *Caracterización molecular y morfológica de genotipos superiores con características de cacao nacional Theobroma cacao L., de Ecuador*. Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza (CATIE).
- Reineccius, G. A., Keeney, P. G., & Weissberger, W. (1972). Factors affecting the concentration of pyrazines in cocoa beans. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 20(2), 202–206.
- Rodríguez, J., Escalona, H. B., Orozco, I., Lugo, E., & Jaramillo, M. E. (2011). Dynamics of volatile and non-volatile compounds in cocoa (*Theobroma cacao* L.) during fermentation and drying processes using principal components analysis. *Food Research International*, 44(1), 250–258. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2010.10.028>
- Roelofsen, P. A. (1958). Fermentation, drying and storage of cocoa beans. *Advances in Food Research*, 8, 225–299.
- Roelofsen, P. A., & Giesberger, G. (1947). Onderzoekingen over cacao bereiding. *Arch. Koffiecult. Ned.-Indie*, 16, 119–159.
- Rohsius, C., & Matissek, R. (2006). Free amino acid amounts in raw cocoas from different origins. *European Food Research and Technology*, (222), 432–438. <https://doi.org/10.1007/s00217-005-0130-y>
- Romero, C., & Zambrano, A. (2012). Análisis de azúcares en pulpa de cacao por colorimetría y electroforesis capilar Analysis of sugars in cocoa pulp by colorimetric and capillary electrophoresis. *Revista Científica UDO Agrícola*, 12(4), 906–913.
- 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*, 26, 167–187.
- Samaniego, I. (2012). *Caracterización de la evolución de los polifenoles durante la fermentación del cacao: Un estudio de Espectroscopía de Infrarrojo Cercano NIRS y HPLC*. Cirad- La

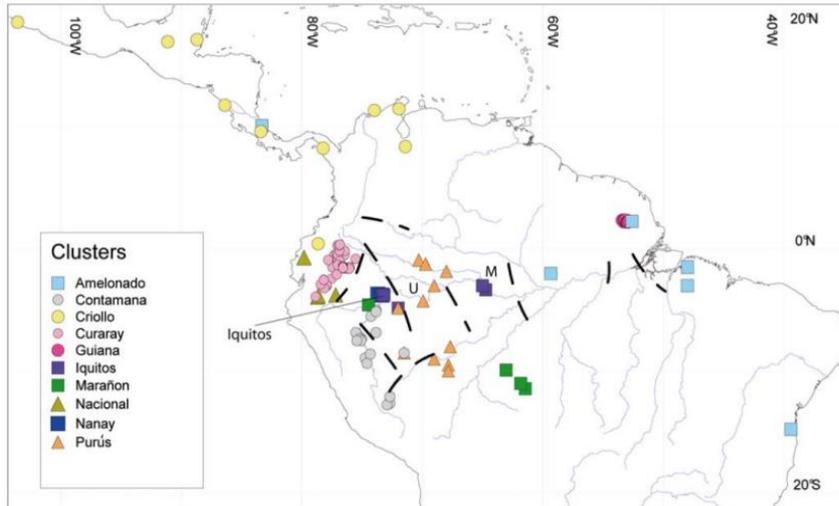
recherche agronomique pour le développement.

- Schroeter, H., Heiss, C., Balzer, J., Kleinbongard, P., Keen, C. L., Hollenberg, N. K., ... Kelm, M. (2006). Epicatechin mediates beneficial effects of flavanol-rich cocoa on vascular function in humans. *PNAS*, *103*(4).
- Schwan, R. F. (1998). Cocoa fermentations conducted with a defined microbial cocktail inoculum. *Applied and Environmental Microbiology*, *64*(4), 1477–1483.
- Schwan, R., Rose, A., & Board, R. (1995). Microbial fermentation of cocoa beans, with emphasis on enzymatic degradation of the pulp. *Journal of Applied Bacteriology Symposium Supplement*, (79), 96S–107.
- Schwan, R., & Wheals, A. (2004a). The microbiology of cocoa fermentation and its role in chocolate quality. Critical Review. *Food Science and Nutrition*, (44), 205–221.
- Schwan, R., & Wheals, A. (2004b). The Microbiology of Cocoa Fermentation and its Role in Chocolate Quality. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, *44*, 1–17.
<https://doi.org/10.1080/10408690490464104>
- Semiz, G., Hejjari, J., Isik, K., & Holopainen, J. K. (2007). Variation in needle terpenoids among *Pinus sylvestris* L. (Pinaceae) provenances from Turkey. *Biochemical Systematics and Ecology*, *35*(10), 652–661. <https://doi.org/10.1016/j.bse.2007.05.013>
- Sievers, M., Alonso, L., Gianotti, S., & Teuber, M. (1996). 16S-23s ribosomal RNA spacer regions of *Acetobacter europaeus* and *A. xylinum*, tRNA genes and antitermination sequences. *Elsevier Science B.V.*, *142*, 43–48.
- Silva, N., Junqueira, A., Silveira, A., Taniwaki, H., Gomes, R., & Santos, S. (2010). *Manual de métodos de análise Microbiológica de Alimentos e água*. São Paulo, Brasil: Livraria Varela.
- Somarriba, E., Astorga, C., Cerda, R., Villalobos, M., Say, E., Prado, J., ... Vásquez, N. (2010). Guía del facilitador: el cacaotal mejorado. Retrieved from file:///D:/Users/PRDR/Downloads/El_cacaotal_mejorado.pdf
- Soria, V. J. (1966). Obtención de clones de cacao por el método de índices de selección. *Instituto Interamericano de Cooperación Para La Agricultura (IICA)*, *16*(2), 119–124.
- Spiller, G. A. (1998). Basic metabolism and physiological effects of the methylxanthines. In G. A. Spiller (Ed.), *Caffeine* (pp. 225–231). Boca Raton, Florida: CRC Press.
- Sukha, D., Butler, D., Umaharan, P., & Boulton, E. (2008). The use of an optimized organoleptic assessment protocol to describe and quantify differentflavour attributes of cocoa liquors made from Ghana and Trinitario beans. *European Food Research and Technology*, *226*(3), 405–413. Retrieved from <http://dx.doi.org/10.1007/s00217-006-0551-2>.

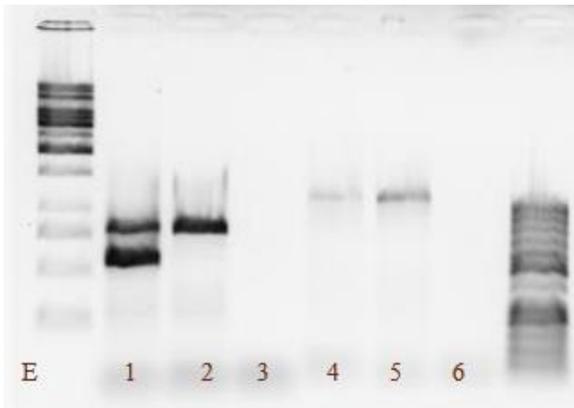
- Taylor, A. J. (2002). *Food flavour technology*. Sheffield, UK: Sheffield Academic Press.
- Taylor, A. J., & Roberts, D. D. (2004). *Flavour perception. The Green Guide. s.d. Organic and Fair Trade Chocolate*. Oxford, UK: Blackwell.
- Temime, S. Ben, Campeol, E., Cioni, P. L., Daoud, D., & Zarrouk, M. (2006). Volatile compounds from Chétoui olive oil and variations induced by growing area. *Food Chemistry*, 99(2), 315–325. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2005.07.046>
- Thi, V., Ho, T., Zhao, J., & Fleet, G. (2014). Yeasts are essential for cocoa bean fermentation. *International Journal of Food Microbiology*, 174, 72–87. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2013.12.014>
- Thompson, S. S., Miller, K. B., & Lopez, A. (1997). Cocoa and coffee. In M. P. Doyle, L. R. Beuchat, & T. J. Montville (Eds.), *Food microbiology: fundamentals and frontiers* (p. 649–661). Washington, DC: ASM Press.
- Thompson, S. S., Miller, K. B., Lopez, A., & Camu, N. (2013). Cocoa and coffee. In M. . Doyle & R. L. Beuchat (Eds.), *Food microbiology: fundamentals and frontiers* (4th ed., pp. 881–889). Washington, USA: ASM Press.
- Thompson, S. S., Miller, K. B., & Lopez, A. S. (2001). Cocoa and coffee. In T. J. M. Doyle, L. R. Beuchat. (Ed.), *Food microbiology — Fundamentals and frontiers* (pp. 721–733). Washington DC, USA: ASM Press.
- Thompson, S. S., Miller, K. B., & Lopez, A. S. (2007a). Cocoa and coffee. In L. . Doyle, M.P., Beuchat (Ed.), *Food microbiology: fundamentals and frontiers* (3rd ed., pp. 837–850). Washington DC, USA: ASM Press.
- Thompson, S. S., Miller, K. B., & Lopez, A. S. (2007b). Cocoa and coffee. In M. . Doyle & L. R. Beuchat (Eds.), *Food microbiology : Fundamentals and frontiers* (2 nd, pp. 837–850). Washington, USA: ASM Press.
- Timbie, D. J., Sechrist, L., & Keeney, P. G. (1978). Application of High-Pressure Liquid Chromatography To the Study of Variables Affecting Theobromine and Caffeine Concentrations in Cocoa Beans. *Journal of Food Science*, 43(2), 560–565. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1978.tb02354.x>
- USDA (United States Department of Agriculture). (2008). Nutrient Data Laboratory.
- Vázquez, A., Molina, F., Núñez, J., & Salvador, M. (2012). Potencial de los marcadores moleculares para el rescate de individuos de *Theobroma cacao* L. de alta calidad. *Sociedad Mexicana de Biotecnología y Bioingeniería A.C., BioTecnología.*, 16(1), 36–46. Retrieved from http://www.smbb.com.mx/revista/Revista_2012_1/Vazquez_Ovando.pdf

- Voigt, J., Biehl, B., Heinrichs, H., Kamaruddin, S., Marsoner, G. G., & Hugi, A. (1994). In-vitro formation of cocoa-specific aroma precursors: aroma-related peptides generated from cocoa-seed protein by co-operation of an aspartic endoprotease and a carboxypeptidase. *Food Chemistry*, *49*(2), 173–180. [https://doi.org/10.1016/0308-8146\(94\)90155-4](https://doi.org/10.1016/0308-8146(94)90155-4)
- Wang, C., & Liu, Y. (2013). Dynamic study of yeast species and *Saccharomyces cerevisiae* strains during the spontaneous fermentations of Muscat blanc in Jingyang, China. *Food Microbiology*, *33*(2), 172–177. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2012.09.014>
- Wollgast, J., & Anklam, E. (2000). Review on polyphenols in *Theobroma cacao*: Changes in composition during the manufacture of chocolate and methodology for identification and quantification. *Food Research International*, *33*, 423–447.

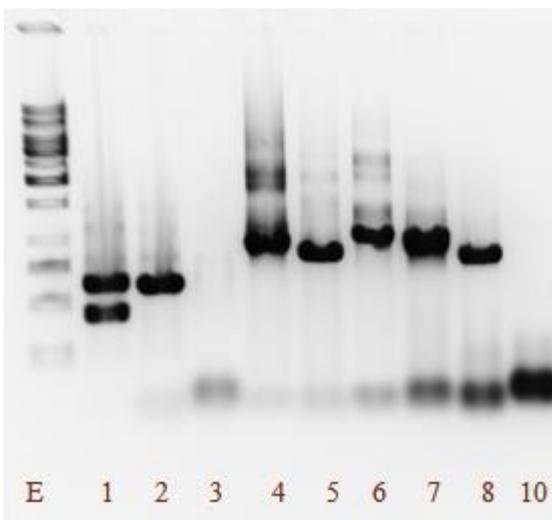
7. ANEXOS



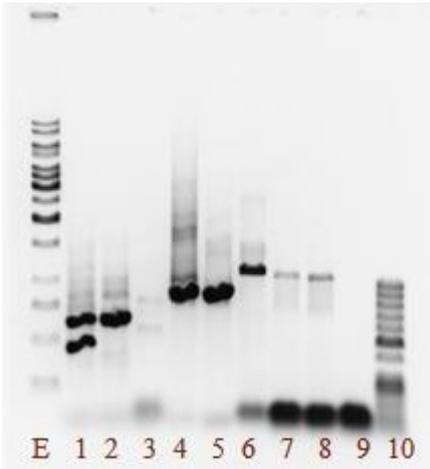
Anexo 1. Localización del origen de los individuos analizados. Nota: los colores indican el grupo genético inferido al que pertenecen. Adaptado de Motamayor *et al.*, 2008.



Anexo 2. Productos de PCR de la levadura inoculada, generados a partir de los imprimadores ITS 4/5 (pozo 1) y LR6/LROR (pozo 4).



Anexo 3. Productos de PCR de la levadura inoculada, generados a partir de los imprimadores CA1/CA5R (pozo 6).



Anexo 4. Productos de PCR de la acetobacteria y levadura inoculados, generados a partir de los imprimadores 16S (pozo 6) y CA21/CA22R (pozo 7).



Anexo 5. Mazorcas de la accesión IMC-20, grupo genético Iquitos.



Anexo 6. Mazorcas de la accesión IMC-27, grupo genético Iquitos.



Anexo 7. Mazorca de la accesión IMC-57, grupo genético Iquitos.



Anexo 8. Mazorca de la accesión IMC-45, grupo genético Iquitos.



Anexo 9. Mazorcas de la accesión IMC-47, grupo genético Iquitos.



Anexo 10. Mazorcas de la accesión IMC-34, grupo genético IQUITOS.



Anexo 11. Mazorcas de la accesión IMC-16, grupo genético IQUITOS.



Anexo 12. Mazorcas de la accesión IMC-54, grupo genético IQUITOS



Anexo 13. Mazorcas de la accesión IMC-107, grupo genético Iquitos.



Anexo 14. Mazorcas de la accesión IMC-17, grupo genético Iquitos.



Anexo 15. Mazorcas de la accesión PA-67, grupo genético Marañón.



Anexo 16. Mazorcas de la accesión PA-188, grupo genético Marañón.



Anexo 17. Mazorcas de la accesión PA-150, grupo genético Marañón.



Anexo 18. Mazorcas de la accesión PA-19, grupo genético Marañón.



Anexo 19. Mazorcas de la accesión PA-13, grupo genético Marañón.



Anexo 20. Mazorcas de la accesión PA-44, grupo genético Marañón.



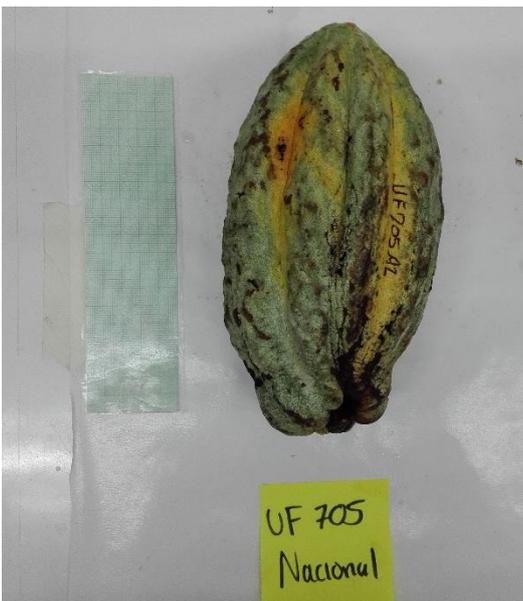
Anexo 21. Mazorcas de la accesión PA-16, PA-56 y PA-70, grupo genético Marañón.



Anexo 22. Mazorcas de la accesión ETT-53, grupo genético Nacional.



Anexo 23. Mazorcas de la accesión ETT-58, grupo genético Nacional.



Anexo 24. Mazorcas de la accesión UF-705, grupo genético Nacional.



Anexo 25. Mazorcas de la accesión UF-273 T1, grupo genético Nacional.



Anexo 26. Mazorcas de la accesión UF-713, grupo genético Nacional.



Anexo 27. Mazorcas de la accesión NA-804, grupo genético Nanay.



Anexo 28. Mazorcas de la accesión Pound-7B, grupo genético Nanay.



Anexo 29. Mazorcas de la accesión Pound-12/A, grupo genético Nanay.



Anexo 30. Mazorcas de la accesión NA-756, grupo genético Nanay.



Anexo 31. Mazorcas de la accesión Pound-16A, grupo genético Nanay.



Anexo 32. Mazorcas de la accesión P-20, grupo genético Nanay.



Anexo 33. Mazorcas de la accesión NA-387, grupo genético Nanay.



Anexo 34. Mazorcas de la accesión P-7p, grupo genético Nanay.



Anexo 35. Mazorcas de la accesión NA-804, grupo genético Nanay.



Anexo 36. Granos de cacao listos para fermentar del grupo genético Nanay, repetición 3.



Anexo 37. Mazorcas de clones CATIE: CATIE-R1, el CATIE-R4, el CATIE-R6, el CC-187, el ICS-95 T1 y el PMCT-58 de Guatuso, repetición 1.



Anexo 38. Mazorcas de clones CATIE: CATIE-R1, el CATIE-R4, el CATIE-R6, el CC-187, el ICS-95 T1 y el PMCT-58 de Guatuso, repetición 2.



Anexo 39. Mazorcas de clones CATIE: CATIE-R1, el CATIE-R4, el CATIE-R6, el CC-187, el ICS-95 T1 y el PMCT-58 de Guatuso, repetición 3.



Anexo 40. Mazorcas de clones CATIE: CATIE-R1, el CATIE-R4, el CATIE-R6, el CC-187, el ICS-95 T1 y el PMCT-58 de Upala, repetición 1.



Anexo 41. Mazorcas de clones CATIE: CATIE-R1, el CATIE-R4, el CATIE-R6, el CC-187, el ICS-95 T1 y el PMCT-58 de Upala, repetición 2.



Anexo 42. Mazorcas de clones CATIE: CATIE-R1, el CATIE-R4, el CATIE-R6, el CC-187, el ICS-95 T1 y el PMCT-58 de Upala, repetición 3.



Anexo 43. Mazorcas de Híbridos de Guatuso, repetición 1.



Anexo 44. Mazorcas de Híbridos de Guatuso, repetición 2.



Anexo 45. Mazorcas de Híbridos de Guatuso, repetición 3.



Anexo 46. Mazorcas de Híbridos de Pavas Upala, repetición 1.



Anexo 47. Mazorcas de Híbridos de Pavas Upala, repetición 2.



Anexo 48. Mazorcas de Híbridos de Pavas Upala, repetición 3.



Anexo 49. Mazorcas de Híbridos de Cuatro Bocas Upala, repetición 1.



Anexo 50. Mazorcas de Híbridos de Cuatro Bocas Upala, repetición 2.



Anexo 51. Mazorcas de Híbridos de Cuatro Bocas Upala, repetición 3.



Anexo 52. Prueba de corte de la fermentación del grupo genético del CATIE: Iquitos, repetición 1.



Anexo 53. Prueba de corte de la fermentación del grupo genético del CATIE: Iquitos, repetición 2.



Anexo 54. Prueba de corte de la fermentación del grupo genético del CATIE: Marañón, repetición 1.



Anexo 55. Prueba de corte de la fermentación del grupo genético del CATIE: Marañón, repetición 2.



Anexo 56. Prueba de corte de la fermentación del grupo genético del CATIE: Marañón, repetición 3.



Anexo 57. Prueba de corte de la fermentación del grupo genético del CATIE: Nacional, repetición 1.



Anexo 58. Prueba de corte de la fermentación del grupo genético del CATIE: Nacional, repetición 2.



Anexo 59. Prueba de corte de la fermentación del grupo genético del CATIE: Nanay, repetición 1.



Anexo 60. Prueba de corte de la fermentación del grupo genético del CATIE: Nanay, repetición 2.



Anexo 61. Prueba de corte de la fermentación del grupo genético del CATIE: Nanay, repetición 3.



Anexo 62. Prueba de corte de la fermentación de clones CATIE Guatuso: repetición 1.



Anexo 63. Prueba de corte de la fermentación de clones CATIE Guatuso: repetición 2.



Anexo 64. Prueba de corte de la fermentación de clones CATIE Guatuso: repetición 3.



Anexo 65. Prueba de corte de la fermentación de clones CATIE Upala: repetición 1.



Anexo 66. Prueba de corte de la fermentación de clones CATIE Upala: repetición 2.



Anexo 67. Prueba de corte de la fermentación de clones CATIE Upala: repetición 3.



Anexo 68. Prueba de corte de la fermentación de Híbridos Guatuso: repetición 1.



Anexo 69. Prueba de corte de la fermentación de Híbridos Guatuso: repetición 2.



Anexo 70. Prueba de corte de la fermentación de Híbridos Guatuso: repetición 3.



Anexo 71. Prueba de corte de la fermentación de Híbridos Pavas Upala: repetición 1.



Anexo 72. Prueba de corte de la fermentación de Híbridos Pavas Upala: repetición 2.



Anexo 73. Prueba de corte de la fermentación de Híbridos Pavas Upala: repetición 3.



Anexo 74. Prueba de corte de la fermentación de Híbridos Cuatro Bocas Upala: repetición 1.



Anexo 75. Prueba de corte de la fermentación de Híbridos Cuatro Bocas Upala: repetición 2.



Anexo 76. Prueba de corte de la fermentación de Híbridos Cuatro Bocas Upala: repetición 3.