



EDUCACIÓN
SECRETARÍA DE EDUCACIÓN PÚBLICA



TECNOLÓGICO
NACIONAL DE MÉXICO



TECNOLOGICO NACIONAL DE MÉXICO

Instituto Tecnológico de Veracruz

**Análisis metabólico durante la fermentación del grano de cacao
(*Theobroma cacao* L.) modulada por consorcios iniciadores**

Tesis

Para obtener el grado de:
Doctora en Ciencias en Alimentos

Presenta:
M. C. Karla Gabriela Álvarez Villagómez

Directores:
Dr. Víctor J. Robles Olvera (†)
Dr. Pedro García Alamilla (UJAT)
Dr. Carlos A. Ledesma Escobar (UCO)

H. Veracruz Ver.

Octubre 2022



EDUCACIÓN



TECNOLÓGICO
NACIONAL DE MÉXICO

Instituto Tecnológico de Veracruz

Subdirección Académica

División de Estudios de Posgrado e Investigación

H. Veracruz, Veracruz, 27 de Agosto de 2022

OFICIO: ITV/DEPI/No.823/2022

Asunto: Autorización de Impresión de Tesis

**C. KARLA GABRIELA ALVAREZ VILLAGOMEZ
PRESENTE**

Por este conducto se le comunica que su tesis de grado **DOCTORADO EN CIENCIAS EN ALIMENTOS** titulada:

"Análisis metabólico durante la fermentación del grano de cacao (*Theobroma cacao* L.) modulada por consorcios iniciadores"

ATENTAMENTE

EXCELENCIA EN EDUCACIÓN TECNOLÓGICA,
ANTORCHA Y LUZ DE FUEGO PERMANENTE.

**OLAYA PIRENE CASTELLANOS ONORIO
JEFE DE LA DIV. EST. POSG. E INVEST.**



TECNOLÓGICO
NACIONAL DE MÉXICO

**INSTITUTO TECNOLÓGICO DE VERACRUZ
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE
POSGRADO E INVESTIGACIÓN**

EL H. JURADO

**MADELEINE HIDALGO MORALES
PRESIDENTA**

**MIRNA LEONOR SUÁREZ QUIROZ
SECRETARIA**

**HUGO SERGIO GARCÍA CALINDO
VOCAL-1**

**CAROLINA PEÑA MONTES
VOCAL-2**

**PEDRO GARCÍA ALAMILLA
VOCAL-3**

**CARLOS AUGUSTO LEDESMA ESCOBAR
SUPLENTE**



Calz. Miguel Ángel de Quevedo 2779, Col. Formando Hogar C.P. 91897, Veracruz, Ver.
Tel. (229) 934 1500 tecnm.mx | veracruz.tecnm.mx



**2022 Flores
Magón**



EDUCACIÓN
SECRETARÍA DE EDUCACIÓN PÚBLICA



TECNOLÓGICO
NACIONAL DE MÉXICO

Instituto Tecnológico de Veracruz
Subdirección Académica
División de Estudios de Posgrado e Investigación

Fue aprobada en su totalidad en cuanto a formato y calidad del contenido a satisfacción del H. Jurado del examen, por lo que está Usted autorizado a editar la presentación definitiva del trabajo.
El presente trabajo de tesis titulado **"Análisis metabólico durante la fermentación del grano de cacao (*Theobroma cacao* L.) modulada por consorcios iniciadores"** presentado por el (la) **C. Karla Gabriela Álvarez Villagomez**, ha sido aprobado por su comité tutorial como requisito parcial para obtener el grado de:

DOCTOR EN CIENCIAS EN ALIMENTOS

DIRECTOR

VICTOR JOSÉ ROBLES OLVERA †

CO-DIRECTOR

PEDRO GARCÍA ALAMILLA

CO-DIRECTOR

CARLOS AUGUSTO LEDESMA ESCOBAR

REVISORA

MIRNA LEONOR SUÁREZ QUIROZ

REVISOR

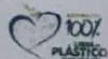
HUGO SERGIO GARCÍA CALINDO

REVISORA

CAROLINA PEÑA MONTES

REVISORA

MADELEINE HIDALGO MORALES



Calz. Miguel Ángel de Quevedo 2779, Col. Formando Hogar C.P. 91897, Veracruz, Ver.
Tel. (229) 934 1500 tecni@veracruz.tecnm.mx | veracruz.tecnm.mx



2022 Flores
de Magón

DEDICATORIA

A mis padres **Norma** y **José**, por estar siempre a mi lado brindarme su invaluable apoyo, ternura y amor. Gracias por ayudarme a construir mis sueños y por enseñarme que el esfuerzo, el trabajo y la perseverancia siempre tienen su recompensa a pesar de las dificultades que representa la vida. Sin su apoyo incondicional en todos los ámbitos, no hubiera podido llegar hasta donde estoy, si tan solo pudieran verse con mis ojos, se darían cuenta de lo mucho que los amo. Nunca olviden que son el motor que me impulsa a seguir esforzándome cada día.

A mis hermanos **Jocy**, **Step**, y sobrino **Dylan** les agradezco por estar presentes aportando cosas buenas a mi vida, por todos los momentos divertidos y por siempre estar para mi mostrándome su respaldo y cariño, doy gracias porque entre nosotros somos el reflejo de nuestras metas y ejemplos a seguir. Los amo con todo mi corazón.

A **Alex** por ocupar un espacio importante en mi vida, por tu cariño y por hacerme feliz con tus ocurrencias, ojalá la vida nos permita compartir juntos muchos logros más.

A mis amigos más cercanos **Alejandra**, **Pau**, **Martha**, **Emir**, **Monse**, **Ely** y **Edgar**. Aquellos amigos que sume **Yazmin**, **Jessy** y **Armando**. Gracias a todos ustedes porque me han brindado sus ánimos y consejos, tanto profesional como personalmente. Creo que todos hemos aprendido y aprenderemos continuamente de todos y de nosotros mismos, les deseo siempre el mejor de los éxitos y espero aun tenernos en el futuro para apoyarnos mutuamente.

RECONOCIMIENTOS

Al **Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT)**, por el apoyo económico recibido durante mis estudios de doctorado, permitiendo el desarrollo y consolidación de esta investigación.

Al Dr. **Víctor José Robles Olvera** (†) siempre estaré enormemente agradecida con usted, por haberme permitido formar parte de su grupo de trabajo, por su apoyo incondicional, por esos ánimos que me hicieron sentir capaz aún en mis momentos de estrés. Su carisma, su atención, su inigualable compromiso y profesionalidad, son sin duda parte de la imagen que llevaré conmigo. Gracias por ser un ejemplo a seguir.

Al Dr. **Pedro García Alamilla** por contribuir durante este tiempo en mi desarrollo profesional. Gracias por todo su tiempo, disposición, por exigirme, compartir conmigo todos sus conocimientos e ideas y por abrirme las puertas de su laboratorio y hacerme participe como un miembro más.

Al Dr. **Carlos Augusto Ledesma Escobar** gracias por recibirme y orientarme no solo durante mi estancia en el extranjero, sino también a distancia y sobre todo por la paciencia aun en los temas que eran nuevos para mí.

Al Dr. **Miguel Ángel García Alvarado** por sus sugerencias, opiniones y asesorías que sin duda impactaron positivamente en el desarrollo de esta investigación.

A cada uno de los miembros de mi comité revisor Dra. **Madeleine Hidalgo Morales**, Dra. **Mirna L. Suárez Quiroz**, Dr. **Hugo S. García Galindo**, Dra. **Carolina Peña Montes** y Dr. **Gerardo Valerio Alfaro** que contribuyeron orientándome mediante sus recomendaciones.

RESUMEN

Álvarez Villagómez, Karla Gabriela. Doctorado en Ciencias en Alimentos. Unidad de Investigación y Desarrollo en Alimentos. Instituto Tecnológico de Veracruz. **Análisis metabolómico durante la fermentación del grano de cacao (*Theobroma cacao* L.) modulada por consorcios iniciadores.** Directores: Dr. Víctor J. Robles Olvera, Dr. Pedro García Alamilla (UJAT), Dr. Carlos A. Ledesma Escobar (UCO).

El cacao es el principal componente del chocolate. Está ampliamente aceptado que la calidad del cacao depende en gran medida del procesamiento, especialmente de la etapa de fermentación. A pesar de su importancia, este proceso sigue siendo empírico debido a que depende de la microbiota nativa. Actualmente se han aplicado consorcios iniciadores con la finalidad de regular la heterogeneidad de la fermentación, sin embargo, su efecto se ha restringido al estudio de un número limitado de compuestos. Con el objetivo de ampliar el conocimiento, la metabolómica puede utilizarse como herramienta para analizar los cambios globales en el perfil de metabolitos. Para esto, se constituyeron cinco consorcios con *Limosilactobacillus*, *Lactiplantibacillus*, *Acetobacter* y *Saccharomyces*, la fermentación se realizó en cajas de madera con 120 kg de cacao. La evolución de los grupos microbianos y de los metabolitos se estudiaron durante y después de la fermentación. El licor de cacao obtenido con el grano fermentado se analizó sensorialmente. Las pruebas de viabilidad microbiana indicaron que, en la fermentación con granos inoculados, las levaduras y bacterias ácido acéticas (BAA) lograron dominar y prevalecer en mayor cantidad que en las fermentaciones nativas, el aumento de las poblaciones de BAA coincidió con el aumento de temperatura en las cajas de fermentación, a causa de la estimulación de las reacciones exotérmicas de la microbiota aeróbica. Los resultados de la prueba de corte y evaluación sensorial revelaron un 91 % de granos bien fermentados y, sensorialmente, se percibieron atributos dulces y afrutados en el cacao inoculado. Con la información obtenida por MS de las muestras se identificaron 48 compuestos volátiles y 61 compuestos no volátiles por MS/MS. Los resultados revelaron claras diferencias entre las muestras fermentadas con y sin consorcio iniciador, atribuido a un mayor contenido de alcoholes y aldehídos, en comparación con el testigo. Por otro lado, en términos de compuestos no volátiles, los polifenoles y aminoácidos predominaron en la fermentación con consorcio, mientras que los alcaloides y azúcares disminuyeron consecutivamente. En general, en todas las etapas postfermentativas de cacao inoculado se observó la presencia de metabolitos deseables como la fenilalanina, valina, prolina, glutamato y serina, precursores de aldehídos aromáticos (acetaldehído, acetoina y 2,3-butanodiol) y pirazinas. Estos resultados indican que la aplicación de un consorcio iniciador, en concentraciones superiores a 10^9 - 10^{10} Unidades Formadoras de Colonias (UFC), en volúmenes comerciales de cacao puede mejorar el perfil de volátiles del licor de cacao y potenciar las características sensoriales positivas.

ABSTRACT

Álvarez Villagómez, Karla Gabriela. Doctorado en Ciencias en Alimentos. Unidad de Investigación y Desarrollo en Alimentos. Instituto Tecnológico de Veracruz. **Metabolomic analysis during the fermentation of the cocoa bean (*Theobroma cacao* L.) modulated by starter culture.** Advisors: Dr. Víctor J. Robles Olvera, Dr. Pedro García Alamilla (UJAT), Dr. Carlos A. Ledesma Escobar (UCO).

Cocoa is the main component of chocolate. It is widely accepted that cocoa quality largely depends on the processing, especially the fermentation step. Despite its importance, this process remains empirical because it depends on the native microbiota. Currently, starter culture has been applied in order to regulate the heterogeneity of fermentation, however, their effect has been restricted to the study of a reduced number of compounds. With the aim of obtaining more information, metabolomics can be used as a tool to analyze global changes in the metabolite profile. For this purpose, five consortia were formed with *Limosilactobacillus*, *Lactiplantibacillus*, *Acetobacter* and *Saccharomyces*, and fermentation was carried out in wooden boxes containing 120 kg of cocoa. The evolution of microbial groups and metabolites were studied during and after fermentation. The cocoa liquor obtained from the fermented beans was sensorially analyzed. Microbial viability samples indicated that, in the fermentation with inoculated beans, yeasts and acid acetic acid bacteria (AAB) were able to dominate and prevail in greater quantities than in native fermentations; the increase in AAB populations coincided with the increase in temperature in the fermentation boxes, due to the stimulation of the exothermic reactions of the aerobic microbiota. The results of the cut test and sensory evaluation revealed 91 % of fully fermented beans and, sensorially, sweet and fruity attributes were perceived in the inoculated cocoa. With the information obtained by MS of the samples, 48 volatile compounds and 61 non-volatile compounds were identified by MS/MS. The results revealed clear differences between samples fermented with and without starter culture, attributed to a higher content of alcohols and aldehydes, compared to the control. On the other hand, in terms of non-volatile compounds, polyphenols and amino acids predominated in the fermentation with consortium, while alkaloids and sugars decreased consecutively. In general, the presence of desirable metabolites such as phenylalanine, valine, proline, glutamate and serine, aromatic aldehyde precursors (acetaldehyde, acetoin and 2,3-butanediol) and pyrazines was observed in all post-fermentation stages of inoculated cocoa. These results indicate that the application of a starter culture, at concentrations above 10^9 - 10^{10} Colony Forming Units (CFU), in commercial volumes of cocoa can improve the volatiles profile of cocoa liquor and enhance positive sensory characteristics.

CONTENIDO

	Página
RESUMEN	vi
ABSTRACT	vii
LISTA DE TABLAS	xi
LISTA DE FIGURAS	xii
LISTA DE SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS	xiv
1 INTRODUCCIÓN	1
2 ANTECEDENTES	3
2.1 Importancia y origen de <i>Theobroma cacao</i> L.	3
2.2 Descripción botánica de <i>Theobroma cacao</i> L.	3
2.3 Cultivares y tipos genéticos de cacao	5
2.4 Producción mundial y nacional	6
2.5 Procesamiento de cacao.....	7
2.5.1 Beneficiado postcosecha.....	8
2.5.2 Cosecha y quiebre.....	9
2.5.3 Proceso de fermentación.....	9
2.5.4 Secado.....	28
2.5.5 Manufactura para la producción del chocolate.....	30
2.5.6 Principales compuestos químicos durante las etapas del procesamiento	32
2.6 Metabolómica	37
2.6.1 Proceso general del análisis metabolómico	41
2.6.2 Estudios de metabolómica en alimentos fermentados	49
JUSTIFICACIÓN	51
HIPÓTESIS	51
3 OBJETIVOS	52
3.1 Objetivo general	52
3.2 Objetivos particulares	52
4 MATERIALES Y MÉTODOS	53

4.1.1 Levaduras y bacterias	53
4.1.2 Cinéticas de crecimiento en medio de cultivo de levaduras y bacterias.....	54
4.1.3 Obtención y estandarización del concentrado celular	54
4.1.4 Protocolo de fermentación de los granos de cacao.....	54
4.1.5 Procesos post-fermentativos (secado, tostado y conchado).....	56
4.1.6 Análisis sensorial de licor de cacao.....	57
4.1.7 Análisis del perfil de compuestos volátiles durante la fermentación del cacao	58
4.1.8 Análisis de compuestos no volátiles durante la fermentación de cacao	60
5 RESULTADOS Y DISCUSIÓN	63
5.1 Cinéticas de crecimiento de los microorganismos de los consorcios iniciadores	63
5.2 Estandarización de los consorcios iniciadores.....	65
5.3 Viabilidad de los grupos de microorganismos durante la fermentación de cacao	66
5.3.1 Evolución de las levaduras en las fermentaciones de cacao.....	67
5.3.2 Evolución de BAL en las fermentaciones con y sin consorcio iniciador	68
5.3.3 Evolución de BAA en las fermentaciones con y sin consorcio iniciador.....	69
5.4 Evolución de la temperatura durante las fermentaciones de cacao	70
5.5 Evolución del pH en la pulpa y cotiledón de cacao durante las fermentaciones con y sin consorcio iniciador	72
5.6 Prueba de corte de los granos de cacao fermentados y secos	73
5.7 Análisis sensorial del licor de cacao.....	75
5.8 Análisis del perfil de compuestos volátiles	78
5.8.1 Influencia del consorcio iniciador sobre los compuestos volátiles y los ácidos grasos durante la fermentación del grano de cacao	82
5.8.2 Influencia del consorcio iniciador sobre el perfil de compuestos volátiles durante las etapas postfermentación	87
5.9 Análisis de compuestos no volátiles.....	89
5.9.1 Cambios en los compuestos polares/semipolares durante la fermentación mediante análisis no dirigido	94
5.9.2 Cambios en la fracción polar/semipolar durante el procesamiento post-fermentativo de los granos de cacao	99
5.9.3 Influencia de los consorcios iniciadores sobre el perfil de compuestos volátiles y no volátiles en cacao fermentado.	104

6 CONCLUSIONES	106
7 BIBLIOGRAFÍA	108
8 ANEXOS	119
8.1 Preparación de los medios de cultivo	119

LISTA DE TABLAS

	Página
TABLA 2.1 Características de las enzimas activas durante el beneficio del cacao.....	21
TABLA 2.2 Compuestos aromáticos reportados en cacao fermentado con consorcios iniciadores.....	28
TABLA 4.1 Codificación de licores de cacao fermentados con consorcios iniciadores y con microbiota nativa	58
TABLA 4.2 Atributos y defectos establecidos por el CoEx-2017, para la evaluación sensorial de los licores de cacao.	58
TABLA 5.1 Concentración celular de biomasa de levaduras, BAL y BAA.....	65
TABLA 5.2 Concentración celular de los consorcios utilizados para inocular el cacao.	66
TABLA 5.3 A) Límites de defectos, después de la prueba de corte de acuerdo a la NOM-F-272; B) Grado de fermentación requerido para la comercialización de granos de cacao de alta calidad.....	75
TABLA 5.4 Compuestos volátiles identificados en granos de cacao fermentados sin consorcio iniciador y con consorcio iniciador.	79
TABLA 5.5 Compuestos polares/semipolares identificados a partir de granos de cacao fermentados sin consorcio iniciador y con el consorcio iniciador	90
TABLA 8.1. Composición del medio de cultivo Man-Rogosa-Sharpe	119
TABLA 8.2 Composición del medio CARR modificado.	120
TABLA 8.3 Composición del medio YEPD o YPD.....	120

LISTA DE FIGURAS

	Página
FIGURA 2.1 Partes principales de la mazorca y del grano de cacao.	4
FIGURA 2.2 Producción mundial y nacional del cacao 2020/2021	6
FIGURA 2.3 Proceso de las transformaciones postcosecha e industriales del cacao.	8
FIGURA 2.4 Métodos de fermentación de los granos de cacao.	10
FIGURA 2.5 Fermentación de granos de cacao en los municipios de Tabasco, México....	11
FIGURA 2.6 Sucesión microbiana y producción de metabolitos de levaduras, bacterias ácido lácticas, bacterias ácido acéticas y bacterias formadoras de esporas durante la fermentación del grano de cacao.	12
FIGURA 2.7. Interrelación de la microbiota nativa durante la fermentación del cacao en diferentes continentes	13
FIGURA 2.8 Diversidad microbiana en fermentaciones nativas ubicadas en el estado de Tabasco, México.....	14
FIGURA 2.9 Síntesis de compuestos como parte del metabolismo de las levaduras a partir del consumo de azúcares y su relación con la formación de aromas y sabores	16
FIGURA 2.10 Rutas de fermentación de azúcares a partir de bacterias ácido lácticas.....	18
FIGURA 2.11 Producción de ácido acético a partir de glucosa.....	19
FIGURA 4.1 Características bioquímicas de las cepas de levaduras, BAL y BAA utilizadas en esta investigación.	53
FIGURA 4.2 Clasificación del grano de cacao, basada en la prueba de corte.	57
FIGURA 5.1 Parámetros y cinéticas de crecimiento.....	63
FIGURA 5.2 Evolución de las levaduras durante la fermentación de granos de cacao.	67
FIGURA 5.3 Evolución de la BAL durante la fermentación de granos de cacao.	69
FIGURA 5.4 Evolución de BAA durante la fermentación de granos de cacao.	70
FIGURA 5.5 Evolución de la temperatura durante la fermentación de granos de cacao....	71
FIGURA 5.6 Evolución del pH; durante la fermentación de granos de cacao con y sin consorcio iniciador.	72

FIGURA 5.7 Porcentaje de granos secos por lote de cacao, según la clasificación de la prueba de corte..	73
FIGURA 5.8 Perfiles de sabor del licor de cacao producido a partir de granos de cacao fermentados con y sin consorcio iniciador	76
FIGURA 5.9 Perfiles de sabor del licor de cacao producido a partir de granos de cacao fermentados con y sin consorcio iniciador	77
FIGURA 5.10 Análisis de componentes principales de los compuestos volátiles de muestras de cacao fermentado	82
FIGURA 5.11 Evolución de los ácidos carboxílicos (A), alcoholes (B) y aldehídos (C) durante la fermentación de los granos de cacao con (C4) y sin (T1) consorcio iniciador....	85
FIGURA 5.12 Cambios en los grupos de metabolitos durante la postfermentación de granos de cacao fermentados con (C4) y sin (T1) consorcio iniciador.....	88
FIGURA 5.13 Análisis de componentes principales de los compuestos no volátiles de muestras de cacao fermentados	95
FIGURA 5.14 Evolución de alcaloides (A), flavonoides y derivados (B), aminoácidos (C) y azúcares (D) durante la fermentación de los granos de cacao con (C4) y sin (T1) consorcio iniciador.	96
FIGURA 5.15 Cambios en los grupos de compuestos polares/semipolares durante el procesamiento postfermentativo de los granos de cacao fermentados con (C4) y sin (T1) consorcio iniciador.	100

LISTA DE SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS

AG	Ácidos grasos
ANOVA	Análisis de Varianza
APCI	Ionización química a presión
BAL	Bacterias ácido lácticas
BAA	Bacterias ácido acéticas
CE	Electroforesis capilar
CI	Ionización química
DO	Densidad óptica
EI	Ionización de impacto electrónico
ESI	Ionización por electrospray
GC	Cromatografía de gases
LC	Cromatografía de líquidos
MRS	Man, Rogosa y Sharpe
MS	Espectrometría de masas
MVDA	Análisis de datos multivariado
NIST	Instituto Nacional de Estándares y Tecnología
PCA	Análisis de componentes principales
PTEE	Politetrafluoroetileno
QTOF	Cuadrupolo tiempo de vuelo
QqQ	Triple cuadrupolo
RFLP	Polimorfismo de fragmentos de restricción
RMN	Resonancia magnética nuclear
tR	Tiempo de retención
tims	Movilidad iónica
TOF	Tiempo de vuelo
UFC	Unidades formadoras de colonias
YPD	Extracto de levadura, peptona, dextrosa

1 INTRODUCCIÓN

El cacao (*Theobroma cacao* L.) es uno de los principales cultivos de exportación del mundo (ICCO, 2020/2021). En México ha sido apreciado desde su domesticación en la época prehispánica por sus atributos sensoriales (Rodríguez-Campos *et al.*, 2012; Hernández-Hernández *et al.*, 2018). En la actualidad, el cacao es el constituyente esencial del chocolate y de otros subproductos de interés comercial. Su calidad está relacionada con un perfil distintivo tanto de aroma como de sabor, muy apreciado por los consumidores (Pedan *et al.*, 2017; Mohamadi Alasti *et al.*, 2019; Rottiers *et al.*, 2019). Los granos de cacao crudos tienen un efecto sensorial amargo y astringente, por lo tanto, para conseguir atributos sensoriales positivos (melaza, frutos rojos, miel, etc.) dependen de un procesamiento postcosecha y de etapas subsecuentes como el tostado, refinado (conchado) y temperado (Mohamadi Alasti *et al.*, 2019).

En este contexto, la fermentación del cacao tiene como objetivo desencadenar un conjunto de reacciones bioquímicas y enzimáticas que conducen a la formación de algunos precursores químicos relacionados con el aroma, el sabor y el color en los granos (Apriyanto & Harmayani, 2017). Este proceso involucra complejas actividades microbianas, promovidas principalmente por levaduras, bacterias lácticas (BAL) y bacterias acéticas (BAA), además de bacterias formadoras de esporas y, en ocasiones, hongos filamentosos (Castro-Alayo *et al.*, 2019). Estos microorganismos utilizan los sustratos presentes en la pulpa del cacao como fuente de carbono y nitrógeno para producir, principalmente, etanol, ésteres, ácido acético, láctico, y otros metabolitos microbianos (Ganeswari *et al.*, 2015; Meersman *et al.*, 2016; Visintin *et al.*, 2017; Mohamadi Alasti *et al.*, 2019). En muchas regiones del mundo, el proceso de fermentación tradicional depende de la microbiota nativa, lo que da lugar a la heterogeneidad de las poblaciones microbianas y, por tanto, a la incoherencia de los perfiles de los metabolitos producidos, dado que se pueden obtener atributos sensoriales positivos y/o defectos sensoriales. La falta de homogeneidad puede dar lugar a productos clasificados como de baja calidad. Con fines de investigación, se han aplicado consorcios iniciadores para que sean dominantes y/o beneficiosos durante los procesos de fermentación, basándose en su

capacidad para producir metabolitos secundarios deseables (Lefeber *et al.*, 2012; Magalhães da Veiga Moreira *et al.*, 2017; Assi-Clair *et al.*, 2019). En este sentido, se ha estudiado la fermentación del cacao a pequeña escala utilizando poblaciones de 10^5 - 10^{10} /g UFC de consorcios compuestos por una o más cepas de *Saccharomyces*, *Hanseniaspora*, *Kluyveromyces*, *Torulaspora*, *Limosilactobacillus*, *Lactiplantibacillus*, *Pichia* y *Acetobacter*. Todos estos estudios coinciden en que el uso de microorganismos iniciadores puede reducir el tiempo de fermentación, promover la competitividad o incluso inhibir la microbiota nativa, lo que conduce a una mejora de la calidad y los perfiles sensoriales de los productos finales (Lefeber *et al.*, 2012; Crafacck *et al.*, 2013; Batista *et al.*, 2016; Sandhya *et al.*, 2016; Assi-Clair *et al.*, 2019; Díaz-Muñoz *et al.*, 2021). Además, la mayoría de estos estudios han concluido que el perfil aromático final depende también del cultivar de cacao y del proceso de postfermentación aplicado. A pesar del gran número de estudios sobre el uso de consorcios iniciadores para la fermentación del cacao, es destacable que la mayoría de ellos se han realizado a escala de laboratorio, además, los cambios en el perfil volátil durante la fermentación y en las etapas postfermentativas, han sido poco estudiados.

En un intento por ampliar el conocimiento del efecto de los consorcios iniciadores en la producción de chocolate, en esta investigación, se propuso estudiar los cambios de los compuestos volátiles y no volátiles, mediante un análisis metabolómico, durante y después de la fermentación, en volúmenes comerciales de cacao Trinitario Mexicano (120 kg cada uno), utilizando consorcios iniciadores, comparado contra la fermentación por microbiota nativa.

2 ANTECEDENTES

2.1 Importancia y origen de *Theobroma cacao* L.

El género *Theobroma* pertenece a la familia *Malvaceae* con 22 especies descritas, siendo el árbol de *T. cacao* L., la única especie que produce granos utilizados para la obtención de licor de cacao, cacao en polvo y manteca de cacao, que son los principales ingredientes del chocolate y otros subproductos de interés comercial, cuyo valor y calidad están relacionados con sabores únicos y complejos (Batista *et al.*, 2015; Caligiani *et al.*, 2016; Sandhya *et al.*, 2016).

La evidencia genética indica que su origen se adjudica a la región Amazónica de América del Sur, extendiéndose gradualmente hacia América Central y México (Motamayor *et al.*, 2002). El grano de cacao fue domesticado por las culturas prehispánicas mesoamericanas, que lo denominaron “alimento de los dioses”; los mayas y aztecas lo utilizaban no sólo como bebida, sino también como moneda y ocasionalmente en rituales (Christopher *et al.*, 2011; Powis *et al.*, 2011). En 1520 se introdujo en España, donde adquirió prestigio y se extendió por toda Europa (Schwan & Wheals, 2004). Con el advenimiento de la industria, los granos de cacao se procesaron y a partir de la combinación de la cocoa, manteca y azúcar se produjo el chocolate.

2.2 Descripción botánica de *Theobroma cacao* L

Theobroma cacao L. es una especie que se distribuye naturalmente en México, se encuentra presente en las zonas tropicales de clima cálido y puede alcanzar una altura de 4 a 7 m en plantaciones comerciales y hasta 20 m o más en el hábitat silvestre, las flores se presentan en racimos a lo largo del tronco y sobre las ramas, pueden presentar una tonalidad rosa, purpúrea y blanca, son de pequeña talla con dimensiones de 0.5 a 1 cm de diámetro con forma de estrella, la floración se produce casi todo el año, principalmente en verano y otoño; mientras que los frutos maduran principalmente en primavera y verano.

El fruto denominado mazorca tiene forma de baya con un tamaño de 15 a 30 cm de largo aproximadamente, cada mazorca contiene de 30 a 40 semillas conocidas comúnmente como granos de cacao (Figura 2.1), están recubiertos por una pulpa mucilaginosa de color blanco de sabor dulce y/o acidulado que presenta valores de pH de 3.0 a 4.0, se compone por agua (82.6 %); azúcares (13.9 %), en los que se incluyen sacarosa, glucosa, fructosa, galactosa y xilosa; proteínas (0.7 %); ácido cítrico (1.3 %); grasas (0.4 %); minerales como K^{1+} , Na^{1+} , Cu^{2+} , Ca^{2+} , Fe^{2+} , Zn^{2+} , Mg^{2+} y Ni^{2+} (0.24 %); y vitaminas (0.05 %) B1, B2, B3 y B12 (Ozturk y Young, 2017).

En el interior del grano de cacao se encuentran los cotiledones que pueden ser de color morado, violeta, rosado o blanco, según el genotipo, provistos del embrión y cubiertos por una cáscara denominada testa (Kongor *et al.*, 2016). Contienen agua (32 a 39 %); grasa (30 a 32 %); proteínas (8 a 10 %) incluyendo albúmina y globulinas de clase vicilina (7S); azúcares (7 %); pentosas (4 %); teobromina (2 %); cafeína (1 %); polifenoles (5 %); ácidos (1 %) y sales (2 %), el rango de pH se encuentra entre 6.0 a 6.5 (Kongor *et al.*, 2016; Ozturk & Young, 2017). Desde el punto de vista químico, los granos de cacao son una fuente de compuestos de aroma y sabor característicos, cuya composición varía considerablemente según el genotipo y el origen geográfico.

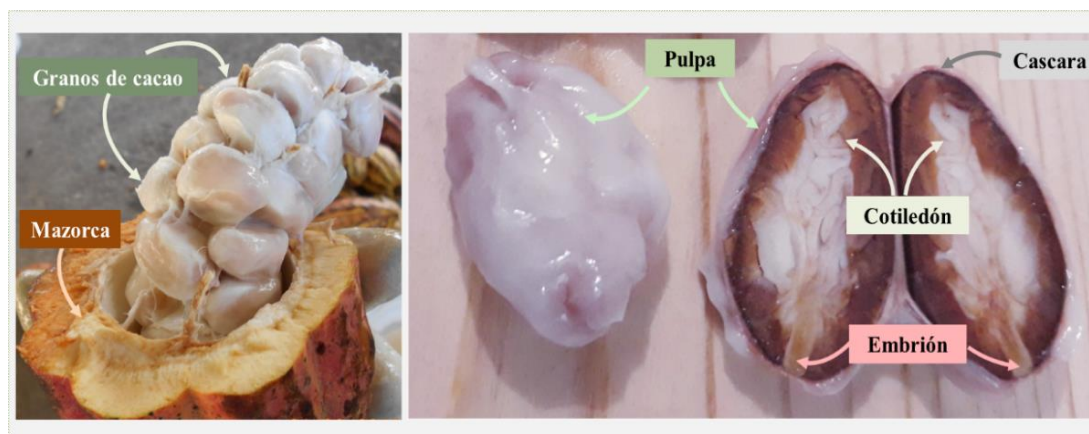


FIGURA 2.1 Partes principales de la mazorca y del grano de cacao.

2.3 Cultivares y tipos genéticos de cacao

Dentro de *Teobroma cacao* L., se pueden identificar diferentes subespecies, que se clasifican en cuatro cultivares: Criollo, Forastero, Trinitario y Nacional.

(I) El Criollo es el cultivar más comúnmente encontrado en América Central y del Sur, es especialmente conocido por ser procesado con un periodo de fermentación muy corto o ausente. Otros nombres que ha recibido son Bahía y Sánchez. A mediados del siglo XVIII el cacao criollo dominaba el mercado, pero debido a su susceptibilidad a las enfermedades, hoy en día apenas se cultiva, sin embargo, es el cultivar que produce el chocolate de mayor calidad. En diferentes estudios se ha reportado que los chocolates producidos tienen altos niveles de procianidinas, la principal clase de polifenoles en el cacao (Counet *et al.*, 2004) y contienen una alta cantidad de pirazinas, que forman compuestos aromáticos a través de las reacciones de Maillard durante el proceso de tostado (Bonvehí, 2005; Castro-Alayo *et al.*, 2019).

(II) El Forastero, endémico de la región amazónica, incluye dos subgrupos Amazon y Amelonado; es muy productivo y es el que domina la producción de cacao en el mundo, además de ser moderadamente resistente a plagas y enfermedades (Lima *et al.*, 2011), sin embargo en comparación con el Criollo, el Forastero mostró niveles más bajos de procianidinas; una cantidad variable de pirazinas entre lotes del mismo cultivar (Counet *et al.*, 2004) y una menor concentración de compuestos aromáticos.

(III) Las poblaciones de Trinitario se consideran pertenecientes a los forasteros, aunque descienden de un cruce entre Criollo y Forastero, la plantación comenzó en Trinidad, se extendió a Venezuela y luego a Ecuador, Camerún, Samoa, Sri Lanka, Java y Papúa Nueva Guinea (ICCO, 2013), este cacao se considera de alta calidad para la producción de chocolate (Saltini *et al.*, 2013).

(IV) Nacional es un tipo de cultivar que crece en Ecuador y que tiene una concentración muy baja de azúcares reductores, así como niveles bajos de pirazinas después del procesamiento postcosecha (Ostovar & Keeney, 1973).

La literatura señala estos cultivares como los principales, sin embargo, la hibridación entre cultivares, provoca diversidad genética entre ellos (Saltini *et al.*, 2013). Motamayor *et al.*, (2008) realizaron estudios con marcadores moleculares para determinar la diversidad genética del cacao y propusieron una nueva clasificación del germoplasma del cacao en 10 grupos representativos: Mara  n, Curaray, Criollo, Iquitos, Nanay, Contamara, Amelonado, Purus, Nacional y Guiana, estos nombres fueron asignados de acuerdo a su ubicaci  n geogr  fica o al sitio donde se han cultivado tradicionalmente. Esta nueva clasificaci  n refleja con mayor precisi  n la diversidad gen  tica.

2.4 Producci  n mundial y nacional

El cacao se encuentra entre los principales cultivos de exportaci  n del mundo, con una producci  n mundial de 4843 miles de toneladas estimadas para el a  o 2020/2021 (ICCO, 2021). En la Figura 2.2, se muestra que la principal producci  n de cacao se concentra en   frica representando el 76.1 % de la producci  n mundial total, seguida de Am  rica Latina (18.2 %) y Asia y Ocean  a (5.7 %).

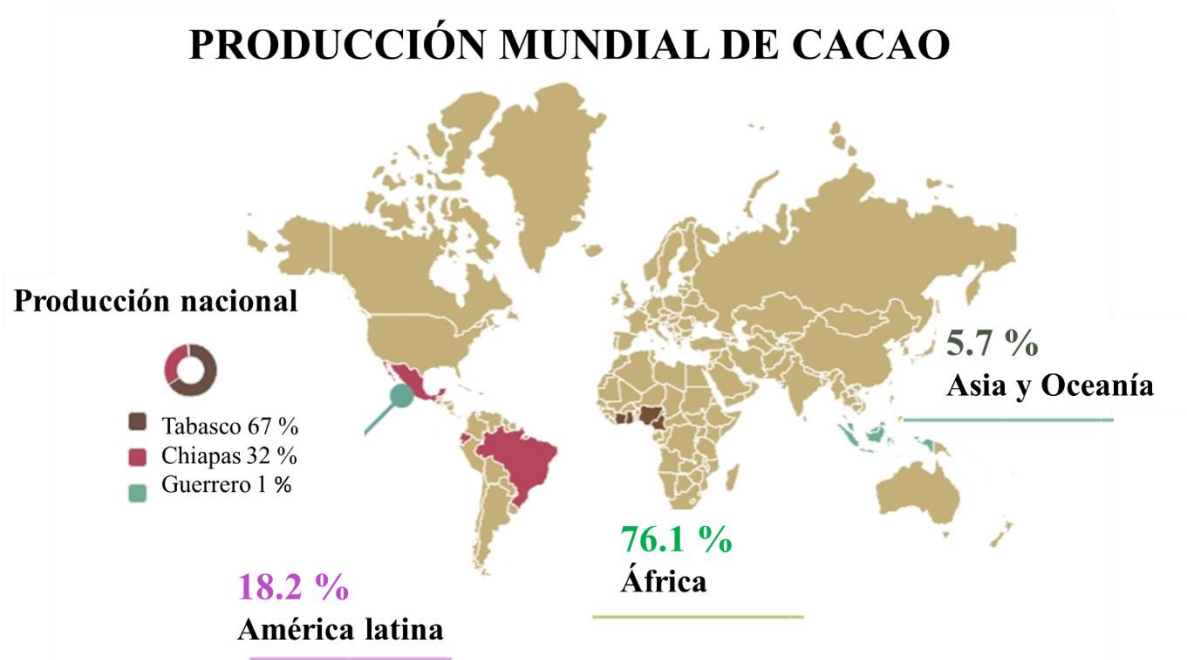


FIGURA 2.2 Producci  n mundial y nacional del cacao 2020/2021 (ICCO, 2021).

Por lo tanto, el cacao contribuye a la generación de ingresos económicos. Al igual que en el mundo, en México el cacao es uno de los productos agrícolas con mayor potencial en las regiones tropicales, se cultivan alrededor de 60,000 hectáreas, distribuidas principalmente en los estados de Tabasco, Chiapas, Oaxaca y Guerrero, en 2016, se estimó que la producción en estos estados fue de aproximadamente 35 miles de toneladas (SAGARPA, 2017/2030), de los cuales, Tabasco fue la principal entidad productora, los municipios: Huimanguillo, Paraíso, Cárdenas, Tacotalpa, Balancán, Nacajuca, Comalcalco, Cunduacán, Jalpa de Méndez y Teapa se dedican a la siembra del cacao (CEDRSSA, 2020).

La comercialización se realiza para el mercado nacional e internacional a través de cooperativas de productores y en forma independiente mediante productores individuales. El cacao mexicano se consume principalmente en países como Bélgica, Francia y Estados Unidos, que buscan el cacao mexicano “Criollo y Trinitario” por su fino aroma. Estos cacaos son utilizados para elaborar chocolates *"gourmet"*, catalogados por su alto contenido de cacao y bajos porcentajes de azúcar o aditivos como vainilla, leche, etc. Sin embargo, para conseguir la calidad requerida, las características genéticas del tipo de cacao utilizado, deben complementarse con una serie de buenas prácticas postcosecha y del proceso de fabricación del chocolate.

2.5 Procesamiento de cacao

La calidad del cacao está relacionada con un perfil distintivo de aroma y sabor, aunque los granos de cacao crudos tienen a veces notas sensoriales específicas del genotipo, suelen tener un efecto sensorial amargo y astringente, por lo tanto, para conseguir atributos sensoriales positivos dependen del procesamiento que comienza con la recolección de la mazorca y finaliza con la fabricación industrial del producto por parte de las empresas alimentarias, como se muestra en la Figura 2.3.

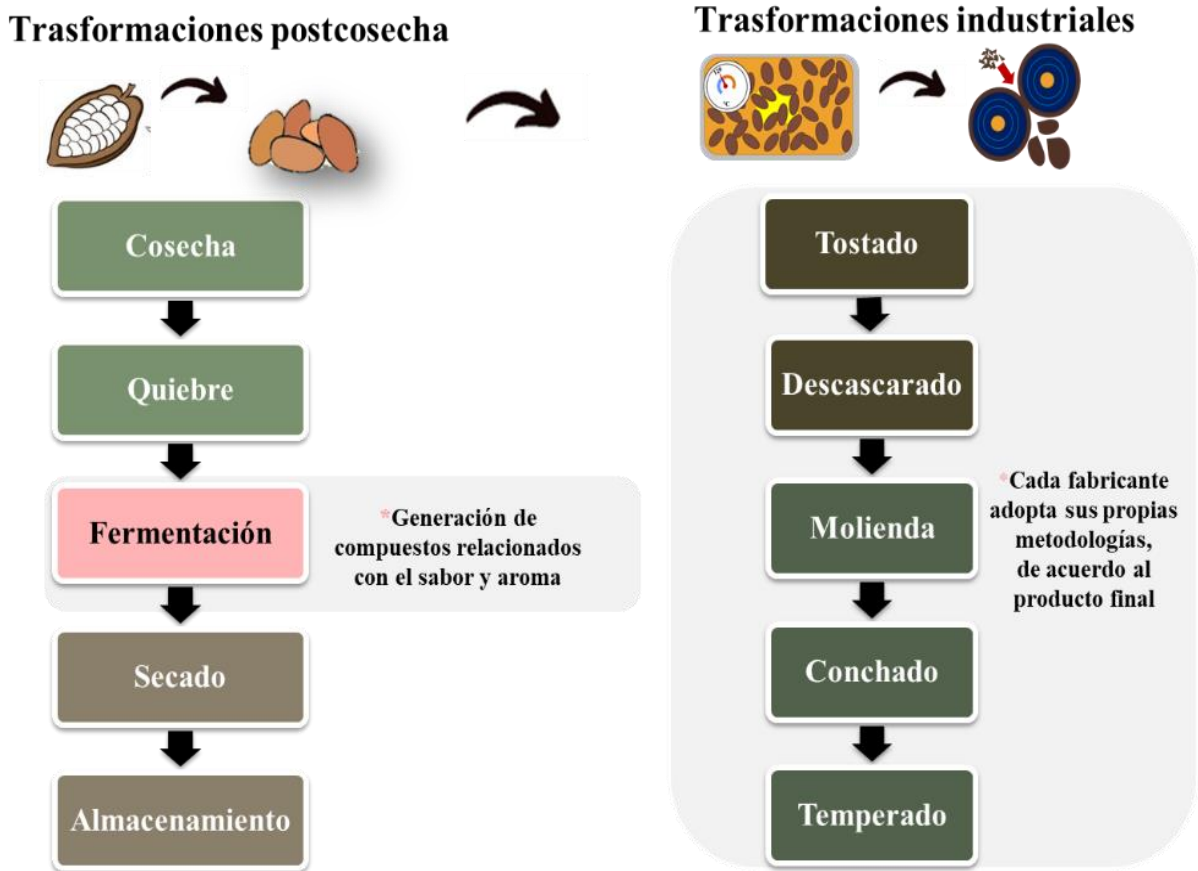


FIGURA 2.3 Proceso de las transformaciones postcosecha e industriales del grano de cacao.

2.5.1 Beneficiado postcosecha

El beneficiado del cacao es fundamental para lograr la calidad requerida por los compradores y fabricantes de chocolate (Aprotosoiaie *et al.*, 2016). Dentro de este proceso intervienen una serie de factores como:

(I) Las características genéticas de los cultivares; (II) las características agroclimáticas de la zona de producción; (III) el manejo proporcionado a la plantación, las condiciones edafoclimáticas en las que se desarrolla la planta; (IV) la cosecha y selección de mazorcas; (V) las prácticas de beneficiado (fermentación y secado) a las que somete el grano; (VI) la selección del grano y (VII) las condiciones de almacenamiento y transporte del grano. A continuación, se describe cada una de las etapas, aunque es importante mencionar que cada

comprador establece sus propios requisitos de calidad del cacao, por lo tanto, el proceso de elaboración puede presentar algunas variaciones.

2.5.2 Cosecha y quiebre

El árbol de *Theobroma cacao* suele empezar a dar frutos a los 3 años y su rendimiento alcanza máximo a los 8 y 9 años (Beg *et al.*, 2017). En algunas regiones, la recolección del cacao se lleva a cabo durante todo el año, pero en algunos países como en México, existe dos temporadas de alta producción al año entre los meses de mayo a diciembre.

La cosecha consiste en cortar y recolectar las mazorcas, se recomienda seleccionar aquellas que se encuentren maduras y sanas, ya que se utilizan para obtener cacao de calidad. Normalmente, el intervalo recomendado entre la recolección y la cosecha es de 8 a 15 días. Si este intervalo se prolonga, se corre el riesgo de perder frutos por exceso de maduración daño por plagas y enfermedades. Las mazorcas se desprenden utilizando tijeras podadoras o cuchilla curva. Es indispensable utilizar este tipo de herramientas para no dañar el árbol ni la mazorca. Una vez cosechadas las mazorcas, se deben colocar en un lugar limpio y, de ser posible, cubrirlas con plástico para evitar que se adhiera alguna materia extraña. Después de cosechadas y clasificadas las mazorcas, deben partirse preferentemente el mismo día para extraer el grano, o como máximo dos días después de la cosecha. La ruptura o quiebre de la mazorca puede realizarse con un machete corto, pero esta práctica requiere destreza por parte del operario para evitar herir o cortar los granos, ya que los granos cortados afectan la calidad final del producto (Dubon & Sánchez, 2016).

2.5.3 Proceso de fermentación

Los granos de cacao frescos son muy astringentes y no desarrollan los típicos aromas y sabores a chocolate, por lo tanto, la razón de la fermentación del cacao tiene como objetivo desencadenar un conjunto de reacciones físicas y bioquímicas dentro del grano que conducen a la formación de precursores de aroma, sabor y color, reducción de sabores amargos,

astringentes y mejora del aspecto físico del cacao (Apriyanto & Harmayani, 2017). La fermentación bien realizada es requisito para la producción de chocolates de alta calidad (Crafack *et al.*, 2013). Existen diferentes variantes de métodos de fermentación (Figura 2.4) según las prácticas locales, siendo un proceso que varía considerablemente de un país a otro, cada beneficiadora adopta su propia metodología.

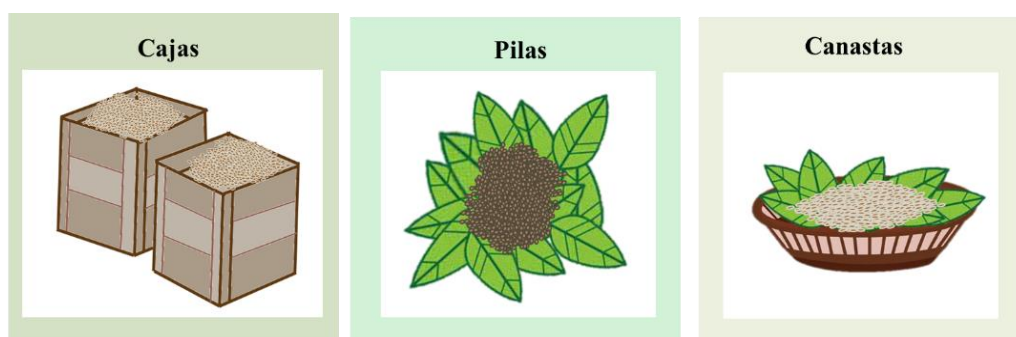


FIGURA 2.4 Métodos de fermentación de los granos de cacao.

En el estado de Tabasco, México, el proceso de fermentación se realiza en cajas de madera, preferentemente de cedro (*Cedrela odorata*), como se muestra en Figura 2.5, ya que es resistente a la humedad, no es resinosa y no guarda malos olores (García Alamilla *et al.*, 2007).

La fermentación en cajas de madera puede realizarse en contenedores de hasta 1 m³, con capacidad de hasta 1 tonelada de grano de cacao; los granos en las cajas se cubren con hojas de plátano o sacos de yute, para conservar el calor, evitar aglomeraciones de granos y propiciar las reacciones bioquímicas que se desarrollan en el interior del grano (Saltini *et al.*, 2013). Los cajones tienen perforaciones en el fondo a través del cual drena el lixiviado (Lima *et al.*, 2011; de Vuyst & Weckx, 2016).



FIGURA 2.5 Fermentación de granos de cacao en los municipios de A) Teapa, B) Comalcalco y C) Paraíso, Tabasco, México.

2.5.3.1 Microorganismos involucrados durante la fermentación

La fermentación de los granos de cacao es un proceso espontáneo y complejo, que es impulsado por un amplio número de microorganismos procedentes del entorno como: levaduras, BAL, BAA, bacterias formadoras de esporas y mohos, que provienen de la superficie de la mazorca; de utensilios como palas, machetes y cestas utilizadas para transportar los granos; de las manos de los trabajadores, de las hojas de plátano usadas para cubrir los granos durante la fermentación o bien, del mucílago seco de las paredes de las cajas de fermentaciones previas. Esta proliferación microbiana varía durante la fermentación, y la contribución de cada grupo de microorganismos en la fermentación desarrolla características particulares en los granos de cacao (Sandhya *et al.*, 2016; Schwan, 1998).

Los roles funcionales de los diferentes grupos de microorganismos han sido discutidos en revisiones recientes de microbiología del grano de cacao publicadas por Schwan & Wheals (2004), Lima *et al.* (2011), de Vuyst & Weckx (2016) y Figueroa-Hernández *et al.*, (2019). En la Figura 2.6, se presenta la sucesión microbiana y las actividades que realiza cada grupo de microorganismos durante la fermentación.

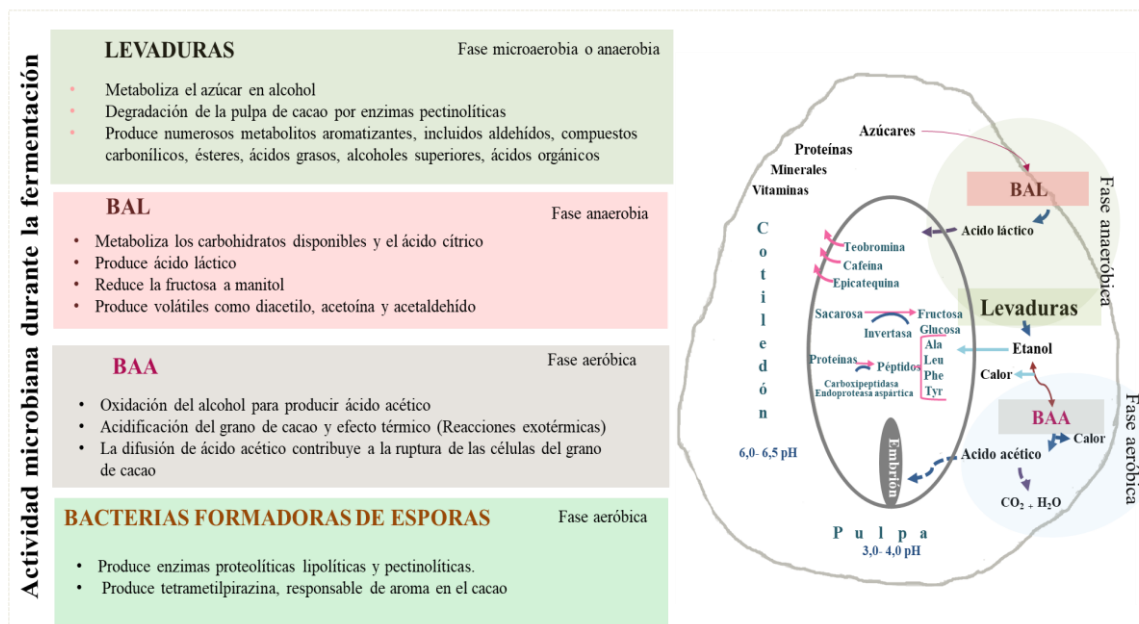


FIGURA 2.6 Sucesión microbiana y producción de metabolitos de levaduras, bacterias ácido lácticas (BAL), bacterias ácido acéticas (BAA) y bacterias formadoras de esporas durante la fermentación del grano de cacao.

Los azúcares presentes en la pulpa mucilaginosa que envuelve al grano de cacao constituyen un medio rico para el crecimiento microbiano, al inicio de la fermentación el alto contenido de pulpa mucilaginosa y los bajos niveles de oxígeno favorecen la colonización de levaduras en las primeras 24 h, al metabolizar los azúcares producen etanol y la liberación de enzimas pectinolíticas. Estas condiciones también favorecen el crecimiento de BAL, que alcanzan su máximo a las 36 h aproximadamente, su papel más importante es degradar la glucosa a ácido láctico. Después de 48 h de fermentación, la población de BAL disminuye debido a que la mayor parte de la pulpa es metabolizada, provocando que el oxígeno penetre la masa de cacao creando un ambiente aerobio que impulsa el crecimiento de BAA, las reacciones exotérmicas generadas por la oxidación de etanol a ácido acético y la oxidación adicional de este último a dióxido de carbono y agua, provoca un aumento en la temperatura hasta 50 °C aproximadamente; hasta el momento, se cree que las condiciones provocadas por las BAA son la causa de la difusión e hidrólisis de las proteínas, por lo que podrían desempeñar un papel clave en la formación de precursores de sabor. Después de 5-6 días de fermentación, la población de BAA disminuye y las bacterias aerobias formadoras de esporas

aumentan su población, éstas pueden contribuir al desarrollo de sabores desagradables (Schwan & Weals, 2004; Saltini *et al.*, 2013). Se ha investigado la diversidad microbiana que existe durante las fermentaciones endógenas de cacao de algunos países africanos, asiáticos y de América Latina mediante técnicas moleculares como: secuencias de fragmentos de ADN, polimorfismo de fragmentos de restricción (RFLP) y, a través de un enfoque metagenómico, se ha utilizado PCR-DGEE (Papalexandratou *et al.*, 2011; Arana-Sánchez *et al.*, 2015; Agyirifo *et al.*, 2019; Serra *et al.*, 2019; Díaz-Muñoz *et al.*, 2021) . El análisis taxonómico de la microbiota nativa en muestras de cacao durante el proceso de fermentación en los distintos continentes se muestra en la Figura 2.7, indicando que existe variación en la microbiota entre los procesos de fermentación.

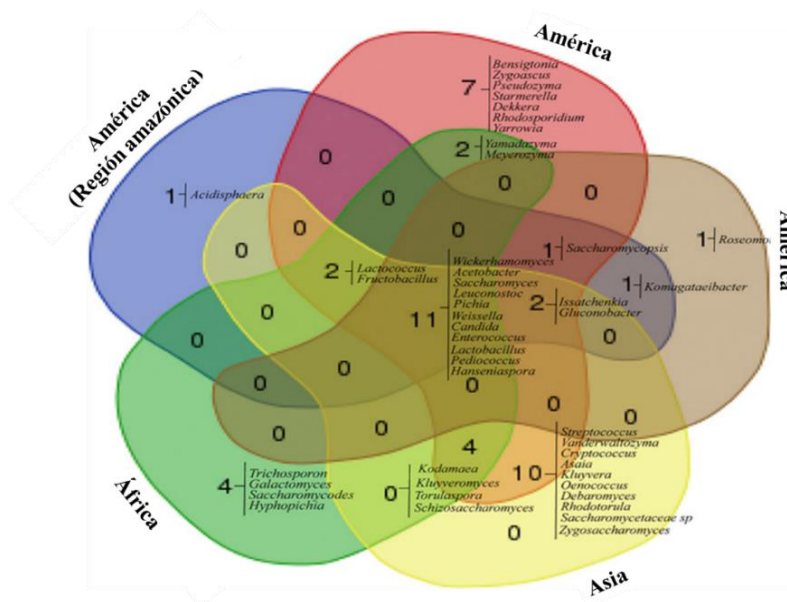


FIGURA 2.7. Interrelación de la microbiota nativa durante la fermentación del cacao en diferentes continentes (Serra *et al.*, 2019).

Del mismo modo, los estudios en los que se han aislado e identificado microorganismos a partir de fermentaciones de cacao de diferentes cultivares realizadas en los municipios de Comalcalco, Huimanguillo y Cunduacán, ubicados en Tabasco, México (Figura 2.8), han mostrado diferencia entre las poblaciones de microorganismos, los resultados han indicado que los géneros *Saccharomyces* y *Candida* fueron las principales

especies dominantes en las fermentaciones en Huimanguillo (Romero Cortes, 2011); en Cunduacán, *Saccharomyces cerevisiae*, *Zygosaccharomyces bailii*, *Torulaspora delbrueckii* y *Hanseniaspora sp*, fueron los más comunes (Arana-Sánchez *et al.*, 2015) y en Comalcalco dominaron *Hanseniaspora sp*. y *Pichia* (Jakobsen & Nielsen 2022).

Debido a que la microbiota nativa tiene un impacto sobre la calidad de los granos de cacao, la diferencia entre las poblaciones de microorganismos presentes durante el proceso fermentativo, conduce a que el producto final sea heterogéneo. A continuación, se describe la función de cada uno de los grupos implicados en la fermentación.



FIGURA 2.8 Diversidad microbiana en fermentaciones nativas ubicadas en el estado de Tabasco, México (Romero Cortes, 2011; Arana-Sánchez *et al.*, 2015; Jakobser & Nielsen, 2021).

▪ Levaduras

Al inicio del proceso de fermentación del grano de cacao, entre 24 y 48 h, las levaduras representan del 40 % al 65 % de los microorganismos reportados, con concentraciones de 10^7 a 10^8 UFC/g; éstas metabolizan la pulpa de cacao provocando el

drenaje de la misma y reduciendo la viscosidad. Diferentes estudios sobre los procesos endógenos de fermentación han mostrado una abundante diversidad de especies de levaduras en donde *Hanseniaspora opuntiae/uvarum* a menudo predomina en las primeras horas de fermentación, debido a su baja tolerancia al etanol, al calor y a la falta de competitividad con las especies de BAL. *S. cerevisiae* suele dominar durante la fermentación debido a su rápido crecimiento a un pH ligeramente superior y a su tolerancia al etanol. Por otro lado, los diferentes géneros de *Hanseniaspora* y *Pichia* se consideran como competidores de sustrato.

La diversidad de especies de levaduras es mucho mayor que las BAL, éstas pueden tener efectos más profundos sobre la eficiencia de la fermentación y la calidad del grano de cacao fermentado, ya sea directa o indirectamente (Ho *et al.*, 2015; Meersman *et al.*, 2015). Entre las actividades metabólicas que realizan algunas levaduras está la producción de etanol a partir de la conversión de azúcares (sacarosa, glucosa y fructosa) presentes en la pulpa mucilaginosa (Camu *et al.*, 2008; Lefeber *et al.*, 2011; Ho *et al.*, 2014). Algunas levaduras, entre ellas *Candida sp.* y *Pichia sp.*, metabolizan el ácido cítrico haciendo que el valor del pH aumente en la pulpa, lo que permite el crecimiento de las bacterias. El ácido cítrico es eliminando a través de los jugos que drenan durante la fermentación. Se ha demostrado la producción de ácidos orgánicos como el ácido acético, oxálico, fosfórico, succínico y málico.

El perfil de compuestos volátiles depende de la cepa y las interacciones con el sustrato y con otros microorganismos, algunas especies de levaduras ejercen como papel secundario la producción de una gran variedad de metabolitos (Figura 2.9) como alcoholes superiores, ácidos grasos y ésteres de ácidos grasos (De Vuyst *et al.*, 2016).

constante flujo y durante las primeras 24 h se ha observado que predominan *Limosilactobacillus fermentum*, *Lactiplantibacillus plantarum*, *Leuconostoc mesenteroides* y *Lactococcus* sp. (Passos *et al.*, 1984; Schwan, 1998), mientras que la presencia de *Pediococcus acidilactici*, *Lactobacillus delbrueckii*, *L. mesenteroides* se observa hasta el final de la fermentación, siendo *L. plantarum* el más frecuente en todo momento.

Según la ecología microbiana, las actividades metabólicas y las posibles funciones de las BAL durante las fermentaciones de cacao, las BAL realizan tres actividades principales durante la fermentación:

(I) fermentan los azúcares de la pulpa mucilagínosa, principalmente glucosa y fructosa produciendo ácido láctico y cantidades menores de etanol y ácido acético; (II) utilizan el ácido cítrico presente en la pulpa para producir ácido láctico, ácido acético, acetaldehído, diacetilo, acetoína y 2,3-butanodiol y (III) algunas especies pueden reducir la fructosa de la pulpa a manitol (Camu *et al.*, 2008; Lefeber *et al.*, 2011; Ho *et al.*, 2014).

En general, la mayoría de las BAL presentes en los granos de cacao son de fermentación homoláctica, como: *L. plantarum*, *Lacticaseibacillus casei*, *L. delbrueckii*, *L. acidophilus*, *L. lactis*, *P. acidilactici* y *Lactococcus lactis* los cuales metabolizan azúcares con la formación de ácido láctico como principal metabolito. Las mismas bacterias pueden metabolizar ácido cítrico con la excreción de subproductos alcalinos, por lo que este tipo de bacterias contribuye al aumento de acidez, para posteriormente disminuirla. Por otro lado, se encuentran las bacterias heterolácticas (*L. mesenteroides* y *Levilactobacillus brevis*), que tienen un efecto importante ya que además de producir ácido láctico también producen ácido acético.

La mayoría de las BAL aisladas durante la fermentación utilizan la glucosa a través la ruta Embden-Meyerhof, sin embargo, algunas especies utilizan la ruta de pentosa vía fosfato para la producción de ácido láctico, etanol, ácido acético, glicerol, manitol, y CO₂ como se representa en la Figura 2.10.

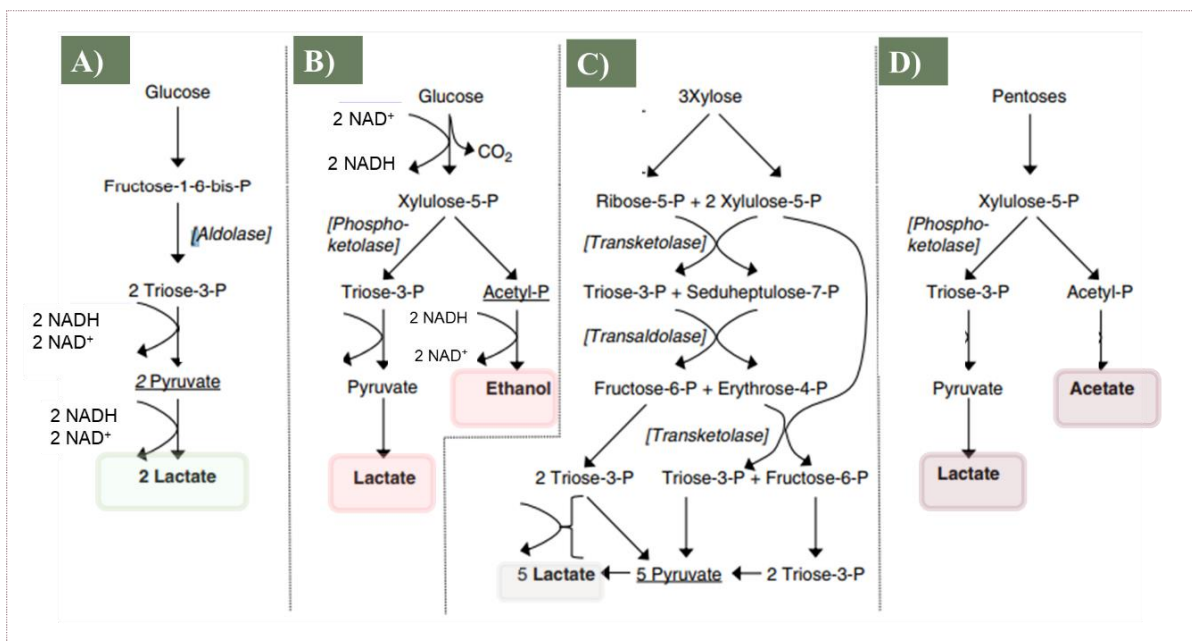


FIGURA 2.10 Rutas de fermentación de azúcares a partir de bacterias ácido lácticas; A) Metabolismo homofermentativo de la glucosa, ruta Emben-Meyerhoff; B) Metabolismo heterofermentativo de la glucosa, ruta de la fosfoacetolasa; C) Metabolismo homofermentativo de las pentosas, ruta pentosa vía del fosfato y D) Metabolismo heterofermentativo de las pentosas ruta de la fosfoacetolasa.

En fermentaciones simuladas de laboratorio utilizando medios de pulpa de cacao y cultivos puros de BAL, se ha confirmado dicho comportamiento metabólico, sin embargo, el impacto de éstos en la calidad del cacao y del chocolate no está bien definido. Hasta ahora, se sabe que la producción excesiva de ácido láctico por estas bacterias, su migración a los granos y su no volatilidad pueden contribuir a la alta acidez de los granos de cacao, provocando una mala calidad (Jinap *et al.*, 1998).

▪ Bacterias ácido acéticas (BAA)

Después del declive de las poblaciones de levaduras y de BAL, la masa fermentativa se airea debido al drenaje de la pulpa, creando condiciones adecuadas para el desarrollo de las BAA que dominan entre las 48 y 120 h de fermentación, especies como *Acetobacter pasteurianus* y *Acetobacter aceti* contribuyen en la fermentación alcanzando concentraciones de 10^5 a 10^6 UFC/g, siendo *Acetobacter* el género más predominante, encontrándose hasta en un 85 % de las fermentaciones reportadas. Las especies de *Gluconobacterias* que son menos comunes,

oxidan la glucosa a ácido glucónico y este ácido puede causar el crecimiento de hongos, así como sabores desagradables en los granos de cacao (Papalexandratou *et al.*, 2011; Ho *et al.*, 2014). En cuanto a las características de crecimiento, *A. aceti* crece a concentraciones de etanol en torno a 5–7.5 %, mientras que *A. pasteurianus* tolera el 10 % (Ardhana & Fleet, 2003). Algunas especies de *Acetobacter* pueden oxidar el etanol producido por las levaduras a ácido acético (Figura 2.11).

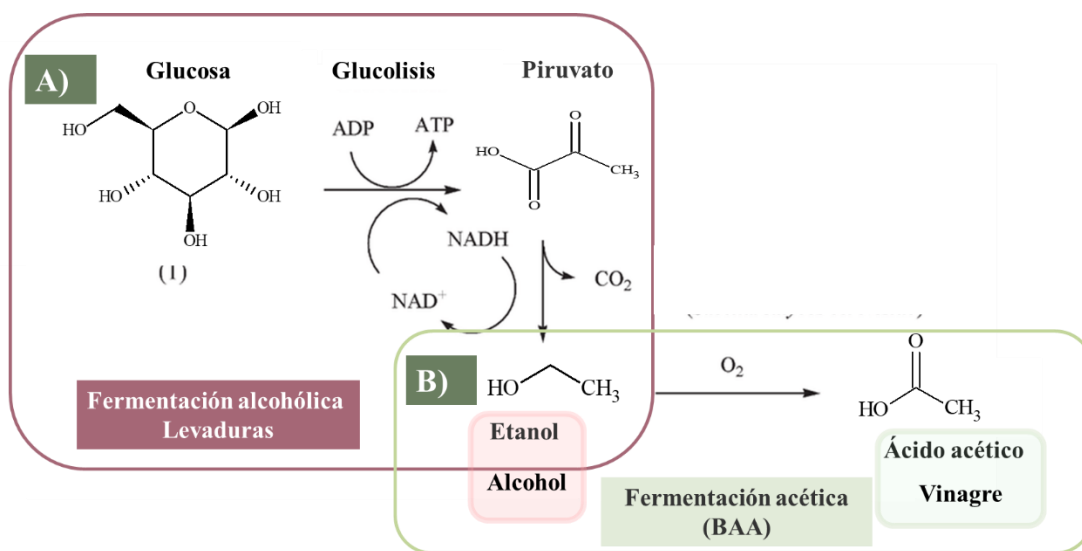


FIGURA 2.11 Producción de ácido acético a partir de glucosa por A) Fermentación alcohólica por levaduras y B) Fermentación acética por BAA.

Las BAA por lo general son tolerantes a los ácidos y crecen a un pH entre 5.4 - 6.3. Su crecimiento trae consigo un aumento de la temperatura de la masa de fermentación (45–50 °C) siendo el ácido acético el que provoca la muerte del embrión liberando enzimas y sustratos que entran en contacto con los compuestos almacenados en el cotiledón, por lo tanto, se ha atribuido que estas bacterias desempeñan un papel importante en la formación de los precursores del sabor y aroma del chocolate.

▪ Bacterias formadoras de esporas

Durante la fermentación de cacao, la presencia de bacterias formadoras de esporas del género *Bacillus* ha sido identificada como un marcador de contaminación. Se ha observado que estos microorganismos comienzan a dominar entre las 48-72 h y a partir de las 120 h aumentan progresivamente hasta el final de la fermentación. Este incremento coincide con el aumento del oxígeno, pH y la temperatura (mayor a 50 °C) de la masa de fermentación (Schwan, 1998; Ardhana & Fleet, 2003). Como estos microorganismos dominan al final de la fermentación, existe la posibilidad de que contribuyan a la formación de aromas desagradables. Las bacterias esporuladas representan solo el 8 % de la microbiota total y *Bacillus subtilis* es el microorganismo predominante de este género.

▪ Hongos filamentosos

Los hongos filamentosos generalmente se presentan en la superficie de las cajas de fermentación, se han observado cuando los tiempos de remoción son largos y la temperatura no alcanza los 45 °C. Estos se han detectado en concentraciones de 10^2 a 10^3 UFC/g, en ocasiones han alcanzado hasta 10^6 – 10^7 UFC/g y representan el 13.7 % de la población total de microorganismos reportados, siendo los más frecuentes los géneros de *Aspergillus* y *Penicilium*. Se ha observado que *Aspergillus niger* y *Geotrichum sp.* Son productores de ácidos después de 24 h de fermentación (Magalhães da Veiga Moreira *et al.*, 2016). Todos los hongos filamentosos aislados han mostrado crecimiento a 37 °C (Ardhana & Fleet, 2003).

2.5.3.2 Actividad enzimática durante la fermentación

La fermentación se produce en dos fases, una fase anaerobia-hidrolítica y otra fase aerobia oxidativa, en las que se producen una serie de reacciones bioquímicas por diferentes enzimas del grano de cacao (Schwan & Wheals, 2004). (I) En la fase anaerobia-hidrolítica, se lleva a cabo la hidrólisis de proteínas, que se degradan a aminoácidos libres y péptidos, así como los azúcares complejos se degradan a azúcares simples, entre las enzimas que catalizan estas reacciones se encuentran las invertasas, glucosidasas y proteasas, que tienen su mayor actividad durante la fase anaeróbica; (II) La fase aeróbica-oxidativa ocurre cuando

el oxígeno penetra en el cotiledón provocando la oxidación de los compuestos fenólicos y desencadenando una serie de reacciones que disminuyen la astringencia del cacao, así también, favorecen el cambio de coloración del grano. Estos cambios oxidativos se producen a partir del cuarto día de fermentación. La polifenol oxidasa es la enzima responsable del oscurecimiento del grano, siendo las catequinas y leucocianidinas los polifenoles sometidos a la oxidación, su actividad se mantiene hasta el secado, donde es inactivada. En la Tabla 2.1 se muestran las principales enzimas que intervienen en el proceso de beneficiado postcosecha del cacao.

TABLA 2.1 Características de las principales enzimas activas durante el beneficio del cacao.

Enzima	Invertasa	Glucosidasa	Proteasa	Polifenol Oxidasa
Sustrato	Testa	Grano	Grano	Grano
Producto	Sacarosa	Glucosidasa Glucósidos (3-B-D-galactosidil cianidina y 3-a-L-araboinosidil cianidina).	Proteínas	Polifenoles (epicatequina)
pH	Glucosa y fructosa	Cianidina y azúcares	Péptidos y aminoácidos	Quinonas
Temperatura (°C)	4.0	5.25	3.8 – 4.5	4.7-6.0
	37 y 52	45	55	31.5-34.5

Doyle *et al.*, 2001

Otras enzimas secretadas por algunos microorganismos también participan durante la fermentación; sin embargo, hasta ahora no hay pruebas de que las enzimas de los microorganismos penetren en la testa y favorezcan la producción de compuestos de sabor y aroma. Las enzimas hidrolíticas dentro de los granos son activadas por metabolitos microbianos tales como ácido acético (Schwan & Weals, 2004).

Entre las enzimas que ayudan a la hidrólisis de la pulpa mucilaginoso se encuentran las enzimas pectinolíticas cuya acción produce los jugos que escurren durante la fermentación. Esta actividad enzimática es crucial durante las primeras 24 h, ya que permite la penetración de oxígeno en la masa de cacao, dando las condiciones para el crecimiento de las BAA; se ha observado actividad pectinolítica en especies como: *K. marxianus*, *S.*

cerevisiae var. *chevaleri* (Schwan, 1998), *Pichia 22nómala* (cepa S16) y *P. kluyveri* (cepa S13Y4), dos cepas de *Hanseniaspora uvarum* (Nielsen *et al.*, 2005), *Hanseniaspora smithiae*, *Debarymyces hansenii* (Geralda *et al.*, 2005), *Kluveromyces fragilis* y *Candida norvegensis*. En algunos de estos estudios, se ha observado que la presencia de una sola cepa parece tener mayor rendimiento en la producción de lixiviados a diferencia de la combinación de varias cepas.

Algunos hongos como: *Mucor pusillus*, *Thermoascus aurantiacus*, *Aspergillus fumigatus* y *Thermoascus aurantiacus* son capaces de provocar pérdida significativa del contenido graso en los granos de cacao reduciéndolo hasta un 13.6 %. Esta actividad lipolítica se ha detectado principalmente en *M. pusillus* y *T. aurantiacus*. La disminución de grasa se puede detectar porque va acompañada de un aumento del contenido de ácidos grasos libres, seguido de la producción de ácidos orgánicos (Ogundero, 1983).

2.5.3.3 Calidad del chocolate y su relación con el proceso fermentativo

La calidad del chocolate depende de varios factores: (I) Las buenas prácticas de procesamiento agrícola y postcosecha, que incluyen el mantenimiento apropiado de los cultivos, el estado fitosanitario, las condiciones edafológicas, la maduración del fruto y la cosecha y (II) un buen procedimiento postcosecha, que implica optimización de las condiciones de apertura de la vaina, fermentación, secado y almacenamiento. Sin embargo, la calidad para muchos países productores de cacao no había sido una prioridad, lo que conducía a menudo al uso de malas prácticas relacionadas con bajo valor del cultivo; actualmente el mercado global ha llegado a la saturación, lo que obliga a los trabajadores a obtener un producto de alta calidad correlacionándolo con una mejor selección de vainas y un mantenimiento adecuado que incluya buenas prácticas higiénicas (Papalexandratou *et al.*, 2011), dado que las empresas fabricantes de chocolate utilizan recetas en las que se añaden aditivos como la vainilla, el azúcar, etc. para mejorar el sabor (Afoakwa *et al.*, 2008; Koné *et al.*, 2016). Aunque la fermentación es uno de los pasos clave que determina la calidad final del cacao, éste sigue siendo un proceso que se realiza de forma artesanal, por lo que los lotes de cacao no tienen las mismas características de fermentación, lo que da lugar a un proceso

impredecible. Como consecuencia, se obtiene diferente calidad sensorial debido a la variedad microbiana presente en el medio.

Se han caracterizado diferentes especies implicadas incluyendo levaduras, BAL, BAA, bacterias esporuladas y hongos filamentosos, destacando que no todas son realmente esenciales (Ostovar & Keeney, 1973; Passos *et al.*, 1984; Schwan, 1998; Lagunes Gálvez *et al.*, 2007; Camu *et al.*, 2008a; Lefeber *et al.*, 2011; Hamdouche *et al.*, 2015). Siendo deseable cambiar la fermentación de un proceso totalmente natural a uno iniciado por un consorcio conocido de microorganismos, como se realiza en varias producciones de alimentos fermentados, como bebidas alcohólicas, panes fermentados, productos lácteos y embutidos (Lefeber *et al.*, 2012; de Vuyst *et al.*, 2016), logrando obtener un producto consistente y confiable, hasta la fecha, se han determinado algunos de los criterios a seguir para la selección de las cepas a utilizar para obtener un resultado exitoso. Con base a la importancia de la contribución de cada uno de los grupos de microorganismos implicados, se ha considerado incluir géneros de los tres principales grupos de microorganismos: levaduras, BAL y BAA.

2.5.3.4 Consorcios iniciadores para la fermentación de cacao

- **Criterios de selección**

Se han destacado algunos de los criterios a seguir para la selección de los microorganismos a utilizar como inóculo, se considera que las levaduras deben de tener la capacidad de producir enzimas pectinolíticas capaces de hidrolizar la pectina presente en la pulpa mucilaginoso, fermentar la gran mayoría de los azúcares de celulosa a pH de entre 3.5 a 4.2, ser tolerante a concentraciones altas de etanol > 7 %, producir metabolitos secundarios como aldehídos, compuestos carbonilos, ésteres, ácidos grasos, alcoholes superiores, ácidos orgánicos, compuestos fenólicos y compuestos que contienen azufre. Los compuestos volátiles como los ésteres confieren atributos frutales a muchas bebidas fermentadas, lo que constituye una cualidad deseable a la hora de seleccionar las cepas de levadura; también se ha demostrado que ayudan a reducir la acidez y a mejorar la degradación de las proteínas del grano. Las levaduras seleccionadas deberán tener un impacto directo en la formación de otros compuestos aromáticos como el etil-2-metilbutanoato, el 2-feniletanol, el ácido 2- y 3-

metilbutanoico, ciertas pirazinas (como la tetrametilpirazina) y en la volatilidad de los ácidos grasos libres de cadena corta (Batista *et al.*, 2015; Meersman *et al.*, 2015).

Para las BAL se considera deseable la producción de metabolitos como ácidos orgánicos (ácido láctico, ácido acético), etanol, manitol y glicerol y compuestos volátiles como diacetilo, acetoína y acetaldehído, ya que se ha confirmado su efecto positivo en el desarrollo de sabor, además debe de metabolizar una amplia cantidad de azúcares y ser tolerante a temperaturas mayores a 40 °C y a pH menores a 3.5 (Schwan, 1998; Meersman *et al.*, 2015).

En diferentes estudios se ha enfatizado que la principal contribución de las BAA es la oxidación del etanol a ácido acético y de ácido acético a CO₂ y agua, se ha reportado que algunas especies de *Acetobacter* tienen esta capacidad oxidante, sin embargo, algunos géneros de *Gluconobacter* no oxidan el etanol, ya que no tienen un conjunto completo de enzimas del ciclo de Krebs (Camu *et al.*, 2008; Adler *et al.*, 2014), siendo también deseable que estas bacterias puedan crecer a una temperatura superior a 40 °C, a un pH inferior a 5.0 y tolerar concentraciones de etanol superiores al 6.0 %.

Romero Cortes (2011), aisló alrededor de 35 especies de levaduras, BAL, BAA y bacilos a partir de fermentaciones endógenas de cacao en Huimanguillo, Tabasco. De las 10 especies de levaduras estudiadas, se observó que *S. cerevisiae* 120 fue capaz de metabolizar glucosa, D-galactosa, sacarosa, maltosa, trehalosa, melecitosa y rafinosa, además de ser catalasa positiva, oxidasa negativa, puede crecer a temperaturas superiores de 40 °C y muestra una alta tolerancia al etanol, es capaz de producir enzimas extracelulares como la endopoligalacturonasa y pectinasa, además de ser una de las especies que se mantuvo con mayor predominio durante toda la fermentación. Entre las BAL identificadas, se determinó que *L. plantarum* 14 es capaz de metabolizar arabinosa, ribosa, galactosa, glucosa, fructosa y xilosa; mientras que *L. fermentum* 16 metaboliza galactosa, glucosa, fructosa, manosa, manitol, sorbitol, metil- α D-manopiranosido, celobiosa, maltosa, sacarosa y rafinosa; ambas cepas mostraron resistencia a concentraciones de etanol de hasta el 10 %.

Con respecto a las BAA, *A. pasteurianus* 98 y *A. tropicalis* 61 fueron capaces de oxidar etanol y mostraron tolerancia a 7 % de etanol. En general, se concluyó que estas cepas pueden ser utilizadas para su posible uso como microorganismos iniciadores.

▪ **Aplicación de consorcios iniciadores en cacao**

La influencia del uso de consorcios iniciadores se ha evaluado mediante el seguimiento de parámetros físicos y químicos. Batista *et al.* (2015), estudiaron la dinámica de tres levaduras (*S. cerevisiae*, *H. uvarum* y *P. kluyveri*) y su influencia en las características sensoriales del chocolate. Estas levaduras se seleccionaron en función de su tolerancia a condiciones de bajo pH y alta temperatura durante la fermentación en ensayos de laboratorio. *S. cerevisiae* predominó con una cantidad 7.2 log UFC/g ya que se inoculó a mayor concentración que las demás; *P. kluyveri* mostró una población de 4.2 log UFC/g y *H. uvarum* una población promedio de 3.9 log UFC/g. En el estudio descrito por Batista *et al.* (2015), se midió la concentración de carbohidratos, etanol y ácidos orgánicos durante la fermentación del cacao. El consumo de azúcares fue más rápido cuando se aplicó el consorcio, obteniendo valores para glucosa y fructosa de 5.4 g/kg y 12.8 g/kg, respectivamente, observándose diferencias significativas con la fermentación endógena (glucosa 13.8 g/kg y fructosa 17.4 g/kg). Asimismo, la concentración de etanol fue mayor en el grano inoculado, alcanzando una producción de 8 g/kg entre las 48 y 72 h (fermentación nativa: etanol 4.6 g/kg a las 96 h). Al final de la fermentación (168 h), la concentración de ácido cítrico se mantuvo en torno a los 14.0 y 12.1 g/kg para ambas fermentaciones respectivamente. Destacando que el uso de consorcios iniciadores puede contribuir a acelerar la muerte de los cotiledones y, en consecuencia, a que el proceso de fermentación sea más rápido. Además, la aceptabilidad de las muestras de chocolate producidas por los dos ensayos diferentes no difirió significativamente.

En otro estudio, se estructuró un consorcio microbiano seleccionando de entre 42 microorganismos identificados durante una fermentación por microbiota nativa, una levadura (*S. cerevisiae* var. *chevalieri*), dos especies de bacterias ácido lácticas (*L. lactis* y *L. platarum*) y dos bacterias ácido acéticas (*A. aceti* y *G. oxydans*; con este consorcio se

inocularon los granos de cacao y se dejaron fermentar durante 7 días. Los resultados indicaron aumento y disminución en las poblaciones de microorganismos similares a las encontradas en una fermentación nativa; tras el tostado y la fabricación del chocolate, la evaluación sensorial determinó que el producto presentaba características de sabor agradables, obteniéndose un producto aceptable para el consumo. Se concluyó que el consorcio utilizado fue adecuado en relación a sus roles fisiológicos, sin embargo, se enfatizó que siempre hay espacio para mejorar ya que no se garantizó que las especies seleccionadas fueran totalmente adecuadas (Schwan, 1998).

Sandhya *et al.* (2016), aplicaron diferentes porcentajes de biomasa (10 al 60 %), de un consorcio que incluía *S. cerevisiae* MTCC173, *L. plantarum* MTCC5422 y *A. aceti* MTCC3347 a una concentración de 10^{10} UFC/g. Los resultados indicaron que el perfil sensorial de chocolate oscuro elaborado con los granos de cacao fermentado con 10 % de biomasa presentó el mejor resultado de 8.5 en la escala hedónica, y también redujo potencialmente el tiempo de fermentación a 3 días, en comparación con los 5 a 7 días en el caso de la fermentación nativa. El cacao fermentado con un 30-60 % de biomasa dio lugar a resultados no deseados, con granos de baja calidad con sabor astringente y agrio y una puntuación de 4.2 a 5.7 en la evaluación sensorial. La fermentación fue más rápida en comparación con una fermentación nativa.

Se observaron resultados similares con granos de cacao fermentados con un consorcio iniciador formado por *S. cerevisiae* H5S5K23, *L. fermentum* 222 y *A. pasteurianus* 386B aislados de fermentaciones endógenas en África Occidental y el Sudeste Asiático, ya que se redujo el tiempo de fermentación y se produjeron granos con características sensoriales de chocolate, independientemente de la región productora y del método de fermentación. Se concluyó que la adición de un consorcio iniciador puede conducir a un producto de alta calidad. También se ha informado de la aceleración de la fermentación cuando se añaden consorcios iniciadores de *S. cerevisiae* H5S5K23, *L. fermentum* 222 y *A. pasteurianus* 386B en fermentaciones en caja o pilas de cacao de Malasia y Ghana, pues los carbohidratos y el ácido cítrico se agotaron en las primeras 24 h, además de producirse etanol, manitol, ácido láctico y ácido acético (Lefeber *et al.*, 2012). La síntesis microbiana y los metabolitos

liberados tuvieron un gran impacto en los precursores del sabor del producto final (Afoakwa *et al.*, 2008; Crafacck *et al.*, 2014).

▪ **Compuestos de aroma y sabor producidos por consorcios iniciadores**

Se ha informado que algunas cepas de levaduras tienen la capacidad de producir una amplia gama de compuestos aromáticos como el acetato de feniletilo (responsable de aromas y sabores a fruta, dulce y miel), el ácido 2-fenilacético y la acetoína, así como alcoholes de fusel, ácidos grasos, y ésteres asociados a sabores a mantequilla y crema (Batista *et al.*, 2015; Visintin *et al.*, 2017). Entre las principales levaduras productoras de compuestos de forma individual se encuentran *K. apiculata*, *S. cerevisiae*, *S. cerevisiae* var. *chevalieri*, *Candida* sp., y *K. marxianus*, por otro lado, Vinícius de Melo Pereira *et al.*, (2017, a partir de fermentaciones de cacao inoculadas con *P. kudriavzevii* LPB06 y *P. kudriavzevii* LPB07 obtuvieron granos con una amplia cantidad de aromas asociados a las cepas utilizadas, siendo capaces de modular el sabor. En otro estudio, se utilizó un inóculo constituido por *S. cerevisiae* FNCC 3056, *L. lactis* FNC 0086 y *A. aceti* FNCC 0016, se obtuvo un aumento de aminoácidos hidrófobos, lo que demostró que la adición del inóculo fue capaz de degradar la proteína para producir más aminoácidos hidrófobos como precursores de aroma (Apriyanto & Harmayani, 2017). La Tabla 2.2 resumen los compuestos procedentes del metabolismo de los diferentes consorcios aplicados.

Algunos autores han llegado a la conclusión de que la calidad del cacao está influenciada por las características ambientales de cada región y culmina con un buen manejo postcosecha. Atribuyendo que la finura de un buen cacao en un 50 % depende del material genético, un 10 % a las condiciones de suelo y clima, un 20 % al proceso de beneficio donde se incluye la etapa de fermentación que como se mencionó anteriormente, se buscan mejoras en el proceso siendo una alternativa la aplicación de cultivos iniciadores, otra etapa que también influye es el secado y el proceso industrial de tostado, refinado y conchado (20 %) que se tratará a continuación (Dubón & Sánchez, 2016).

TABLA 2.2 Compuestos aromáticos reportados en cacao fermentado con consorcios iniciadores.

Autor / Año	Consortio iniciador	Compuestos identificados
Ramos <i>et al.</i> , 2014	<i>S. cerevisiae</i> CA11	Ésteres y alcoholes
Batista <i>et al.</i> , 2016 Bahía, Brasil	<i>S. cerevisiae</i> UCA11 <i>P. kluyveri</i> YCH194 <i>H. uvarum</i> YCH203	Aldehídos (hexenal, nonanal y octanal)
Meersman <i>et al.</i> , 2016 Pahang, Malasia	<i>S. cerevisiae</i> (híbridos) <i>P. kluyveri</i> Y274 <i>C. fabianii</i> Y689	Acetato de éster
Menezes <i>et al.</i> , 2016	<i>S. cerevisiae</i> CA11	Aldehídos, cetonas, ésteres, ácidos, alcoholes, pirazinas y furanos
Kone <i>et al.</i> , 2016 Abijan, África occidental	<i>S. cerevisiae</i> , <i>C. tropicalis</i> , <i>P. kudriavzevii</i> , <i>P. galeiformis</i> , <i>G. geotrichum</i> y <i>W. anomalus</i> .	Esteres, alcoholes y ácidos
Moreira <i>et al.</i> , 2017	<i>P. kudriavzevii</i> , <i>S. cerevisiae</i> , <i>G. geotrichum</i> y <i>W. anomalus</i>	2,3-butanodiol y 2,3-dimetilpirazina
Visintin <i>et al.</i> , 2017 Bahía, Brasil	<i>S. cerevisiae</i> <i>T. delbrueckii</i>	Aldehídos y cetonas
Assi-Clair <i>et al.</i> , 2018 Costa de Marfil	<i>S. cerevisiae</i>	3-metil-1-butanol y 2-feniletanol
Díaz-Muñoz <i>et al.</i> , 2021 Costa rica	<i>S. cerevisiae</i> IMDO 050523, <i>P. kudriavzevii</i> IMDO 020508, <i>L. fermentum</i> IMDO 0611222 y <i>A. pasteurianus</i> IMDO 0506386.	Ésteres, alcoholes, aldehídos, cetonas, ácidos orgánicos, furanos, furanonas, terpenoides, 2,3-butanodiol, octanoato de etilo, acetato de feniletilo y tetrametilpirazina

2.5.4 Secado

Esta práctica consiste en detener la fermentación, reduciendo el contenido de humedad de los granos fermentados del 55 %-60 % del peso seco al 6.5-7 %, evitando así la proliferación de moho durante el almacenamiento. Durante esta etapa, los procesos oxidativos continúan, las polifenoloxidasas aún activas catalizan la transformación de los polifenoles en quinonas, que luego se condensan con grupos amino y sulfhidrilo libres para dar lugar a polímeros marrones (Biehl & Ziegler 2003), estos nuevos compuestos inducen la formación del color marrón característico de los granos de cacao, y también favorecen a la reducción de la astringencia y el amargor; cabe mencionar que la volatilización de los ácidos también es importante para evitar una acidez excesiva en el grano (Aprotosoaie *et al.* , 2016).

Por lo tanto, los indicadores de calidad del cacao incluyen que un grano correctamente secado debe mostrar una baja astringencia, amargor, acidez y ausencia de sabores extraños

como notas ahumadas (Afoakwa *et al.*, 2008). Para ello, el proceso de fermentación también tiene un impacto en la calidad aromática del grano seco, Utrilla-vázquez *et al.*, (2020), han demostrado que los granos de cacao secos y previamente fermentados muestran un mayor contenido de esteres, aldehídos, pirazinas, alcoholes, ácidos y furanos, indicando un perfil aromático más interesante, en comparación con los granos secos sin fermentar los cuales muestran un número reducido de compuestos aromáticos. Además, la elección del método de secado es extremadamente importante. Éste puede llevarse a cabo mediante dos técnicas que se clasifican según el tipo de energía utilizada. El secado natural se realiza exponiendo los granos de cacao a nivel del suelo, directamente a la luz solar, como única fuente de energía para la eliminación de la humedad. El proceso puede variar según las prácticas aplicadas en cada región geográfica del cultivo. En el Estado de Tabasco, México, los granos se extienden sobre camillas o superficies de concreto con un espesor de 2 a 3 cm durante un período de 5 a 15 días, con remociones cada 30-45 min, para permitir un mejor secado de los granos y evitar el apelmazamiento (Figura 2.14). El secado natural al sol permite la oxidación de los compuestos fenólicos y la evaporación del ácido acético, comparado con otros tipos de secado se considera barato y sencillo de aplicar.



FIGURA 2.12. Secado al sol de granos de cacao A) por exposición en camillas soportadas y B) al nivel del suelo.

Entre otros procesos de secado se encuentran los artificiales, que suelen ser eficientes en términos de horas de secado, procesan grandes cantidades de cacao en espacios reducidos en comparación con el secado natural. Después del secado, los granos se someten a una limpieza a fondo, eliminando todos los materiales extraños mezclados con ellos (trozos de

corteza, placenta, etc.), granos negros, mohosos, dañados por insectos, quebrados, arrugados, pegados y trozos de cáscara. Normalmente, se utilizan tamices para la separación y ventiladores para soplar el polvo y los trozos de cáscara. Una vez que el grano está seco y limpio, se empaca en sacos de fique o yute nuevos o en buen estado. Tras el envasado, se coloca en almacenes adecuados para su conservación hasta su comercialización. De los métodos de secados que existen, se prefiere el secado al sol por que otorga un sabor a chocolate más pronunciado (Afoakwa *et al.*, 2008). El secado artificial puede dar lugar a sabores extraños como el ahumado, jamón, caucho o notas de gasolina (Bernaert *et al.*, 2012). Un secado incompleto y remojo a causa de la lluvia produce concentraciones elevadas de compuestos carbonílicos muy olorosos y sabores desagradables (Afoakwa *et al.*, 2008).

La temperatura también juega un papel importante, esta no debe ser superior a 60 °C, porque fragiliza los granos de cacao, les da un olor a quemado y favorece la retención de ácido acético (García-Alamilla, 2005). Además, se considera que la velocidad de secado es crucial, en caso de que la velocidad de secado sea demasiado rápida los granos tenderán a retener una cantidad excesiva de ácidos (acético, propiónico, butírico, isobutírico, isovalérico), lo que es perjudicial para el sabor. Por otro lado, una velocidad de secado demasiado lenta da lugar a baja acidez, a un color más pobre y alta presencia de moho (Saltinini *et al.*, 2013).

2.5.5 Manufactura para la producción del chocolate

Para la producción de chocolate, el grano fermentado y seco se somete a una etapa de tostado, considerada fundamental para el desarrollo de aromas y sabores. El tostado reduce las concentraciones de ácidos volátiles y por lo tanto la acidez disminuye aún más. Por otro lado, los azúcares reductores y aminoácidos libres producidos durante la fermentación, al ser sometidos a temperaturas de alrededor de 130 °C producen reacciones de Maillard o pardeamiento no enzimático, estas reacciones generan una variedad de productos, intermedios y pigmentos marrones (melanoidinas); que contribuyen a la actividad antioxidante, sabor y color del grano tostado. Estos compuestos incluyen alcoholes, éteres, tiazoles, pironas, ácidos, ésteres, aldehídos, iminas, aminas, oxazoles, pirazinas y pirroles (Misnawi *et al.*, 2004). Tras el tostado, los granos de cacao se descascarillan y se trituran

para obtener fracciones de los granos denominados nibs, que luego se muelen para obtener una pasta que se denomina coloquialmente licor de cacao. Este proceso se le conoce como conchado, es esencial para el desarrollo del sabor final y la textura adecuada. En esta etapa se eliminan los ácidos residuales y se agregan los ingredientes de acuerdo al producto requerido, finalmente se realiza el moldeo, cada fabricante sigue sus propias metodologías, de acuerdo al producto final a obtener.

En un intento de mejorar la calidad del chocolate, se han aplicado consorcios iniciadores en la fermentación, como se menciona en la sección 2.5.3.4. Autores como Lefeber *et al.* (2012) indican que los consorcios iniciadores podrían mejorar aún más el contenido de compuestos aromáticos, siempre y cuando se apliquen correctamente las prácticas poscosecha. Craack *et al.*, (2013) indicaron que el uso de levaduras (*P. kluyveri* y *K. marxianus*) y el procesamiento de cacao tostado a 106 °C durante 60 min puede impactar positivamente en las cualidades sensoriales del licor de cacao. En cuanto al desarrollo del color, la fermentación con *K. marxianus* mostró un porcentaje significativamente mayor de coloración marrón en el cacao secado por convección artificial (12 h) y tostado a 150 °C durante 38 min, la coloración es un indicador de granos bien fermentados (Leal *et al.*, 2008); por otro lado, el análisis sensorial en chocolates producidos con granos secados al sol (7 días) y tostados a 140 °C durante 30 min, previamente fermentados con *S. cerevisiae* H5S5K23, *L. fermentum* 222 y *A. pasteurianus* 386B dio altas puntuaciones en notas afrutadas (Lefeber *et al.*, 2012)

Teniendo esto en cuenta, el chocolate siempre se ha caracterizado por esa amplia gama de sabores y atributos aromáticos que vienen dados por compuestos volátiles y no volátiles, que se desarrollan durante los procesos de transformación poscosecha y fabricación, esta serie de compuestos repercuten en el producto final.

2.5.6 Principales compuestos químicos durante las etapas del procesamiento

La química del sabor y aroma del chocolate es compleja (Afoakwa *et al.*, 2008, Bonvehi, 2005, Counet *et al.*, 2004). Algunos de estos componentes son intrínsecos al grano de cacao, otros son generados por el metabolismo de los microorganismos que activan los metabolitos dentro del grano durante la fermentación y otros son generados por las reacciones de Maillard durante el tostado.

2.5.6.1 Alcaloides

Los granos de cacao contienen aproximadamente un 4 % de metilxantinas, siendo la teobromina (3,7-dimetilxantina) el principal alcaloide del cacao (2 % a 3 %), seguido de la cafeína (1,3,7-trimetilxantina), que se encuentra en pequeñas cantidades (0.2 %), estos compuestos son los principales responsables del sabor amargo típico del cacao y los que más contribuyen a la palatabilidad de los productos alimenticios que los contienen.

La concentración de metilxantinas varía según el tipo genético del cacao. Se ha informado que el cacao del cultivar Forastero encontrado en África Occidental contiene 3.9 % de teobromina y 0.19 % de cafeína. El cacao de América Central y del Sur, en cambio, es más rico en cafeína, conteniendo entre 0.3 y 0.6 %, mientras que el contenido de teobromina varía entre 2.8 % y 3.4 %. Durante la fermentación, el contenido de metilxantina disminuye gradualmente después de las primeras 72 h, lo que lleva a una reducción del amargor, la pérdida de teobromina puede oscilar entre el 38 y el 40 %, mientras que la cafeína disminuye de 50 a 54 % (Ho *et al.*, 2014).

2.5.6.2 Flavonoides

Los granos de cacao contienen alrededor de 15 % de flavonoides, siendo una rica fuente de antioxidantes. Estos compuestos son los responsables de conferir sensaciones astringentes y amargas y contribuyen significativamente a los descriptores verdes y afrutados de los licores de cacao (Aprotosoaie *et al.*, 2016). Hay tres grupos principales de polifenoles en los granos de cacao: las catequinas (flavan-3-oles), las antocianinas y las

proantocianidinas. Las catequinas contienen aproximadamente entre el 29 y el 38 % del total de flavonoides, representados por la epicatequina, la catequina, la galocatequina y la epigalocatequina, mientras que la fracción de antocianinas contiene aproximadamente 4 % del total de polifenoles, formada por las leucoantocianinas L1, L2, L4 cianidina-3- α -L-arabinósido y cianidina-3- β -D-galactósido. Las proantocianidinas comprenden aproximadamente entre el 58 % y el 65 %, representadas por dímeros, trímeros u oligómeros de flavan-3,4-dioles, siendo los más importantes B1, B2, B3, B4, B5, C1 y D (Andújar *et al.*, 2012). Las flavonas (apigenina, luteolina, kaempferol y sus glucósidos) y los ácidos fenólicos (ácido cafeico, ácido clorogénico, ácido cumárico, ácido ferúlico y ácido siríngico) se encuentran en menor cantidad, variando su composición según el tipo genético, el grado de madurez y el procesado postcosecha. Por mencionar algunos, el cultivar Criollo tiene un alto contenido de procianidinas, mientras que los Trinitarios y Forasteros tienen concentraciones más bajas. Durante la fermentación y el tostado, se ha observado una reducción de las procianidinas, posiblemente debido a las reacciones de polimerización o a las altas temperaturas de tostado por encima de 140 °C (Mayorga-Gross *et al.*, 2016; Di Mattia *et al.*, 2017).

2.5.6.3 Proteínas

Las proteínas presentes en los granos cacao oscilan entre el 10 y el 16 %, con una fracción de albúmina (52 %) y una fracción de globulina (43 %), esta última representada por una globulina de la clase vicilina (7S) compuesta por 3 subunidades de 47, 31 y 15 kDa, respectivamente, sufren cambios mediados por enzimas durante la fermentación, como la endoproteasa de cisteína, la exopeptidasa de serilo de escisión de *p*-nitroanilida de leucina, la endoproteasa aspártica y la carboxipeptidasa (Voigt *et al.*, 1994), la degradación de la albúmina y la globulina similar a la vicilina (7S) producen en gran medida oligopéptidos hidrofóbicos que luego se convierten en oligopéptidos hidrofílicos y aminoácidos libres hidrofóbicos, los cuales juegan un papel importante en el desarrollo del sabor del cacao como contribuyentes a las reacciones de Maillard durante la etapa de tostado (Mayorga-Gross *et al.*, 2016), se ha determinado que el contenido de proteína es variable con respecto al tipo genético del cacao, Voigt *et al.* (2003) reportaron que el cacao Forastero contiene una mayor

cantidad de proteína que los granos Criollo, sin embargo, no se conoce bien la dinámica de la formación de péptidos en el curso de la fermentación.

2.5.6.4 Azúcares

Los granos de cacao contienen entre 2 y 4 % de azúcares libres (fructosa, glucosa, glucosa), sacarosa, galactosa, sorbosa, xilosa, arabinosa, manitol e inositol) y aproximadamente un 12 % de polisacáridos (almidón, pectinas, celulosa, pentosanos y mucílagos). Cabe destacar que, en el grano sin fermentar, la sacarosa representa aproximadamente el 90 % del total de azúcares. La pulpa mucilaginosa de las semillas maduras contiene cantidades variables de azúcares (hexosas y sacarosa) y polisacáridos (pectinas, hemicelulosas y celulosa). Durante la fermentación, la sacarosa se metaboliza hasta azúcares reductores (fructosa y glucosa) debido a la actividad de la β -fructofuranosidasa.

En los granos de Criollo, se ha observado una alta concentración de azúcares reductores en comparación con el cultivar Nacional, que muestra niveles más bajos de azúcares reductores después de la fermentación (Giacometti *et al.*, 2015). La concentración de azúcares reductores en las semillas fermentadas es importante porque a través de las reacciones de Maillard reaccionan con los aminoácidos durante el tostado (Afokwa *et al.*, 2008) para desarrollar el sabor a chocolate.

2.5.6.5 Etanol

El etanol es un metabolito obtenido a través del metabolismo de las levaduras, su concentración es alta en las primeras horas de fermentación, mostrando una disminución en las etapas posteriores debido a su oxidación a ácido acético por acción de las BAL (Camu *et al.*, 2008a; Papalexandratou *et al.*, 2011), sin embargo, las concentraciones máximas de etanol reportadas en las fracciones de pulpa varían de 5 a 60 mg/g, tales variaciones pueden explicarse por el hecho de que durante la fermentación hay levaduras altamente fermentativas como *Saccharomyces*, que en comparación con especies como *Hanseniaspora*, *Pichia* y *Kluyveromyces* tienen menor capacidad fermentativa (Ardhana & Fleet, 2003; Batista *et al.*, 2015).

2.5.6.6 Glicerol y manitol

El glicerol es un producto secundario del metabolismo de las BAL y contribuye a las propiedades sensoriales otorgando atributos a dulce (De Vuyst *et al.*, 2016). Por otro lado, últimamente varios autores han informado la producción de manitol en la pulpa en una cantidad de 9 -35 mg/g y su producción está relacionada con el crecimiento de *Lactobacillus fermentum* y con su capacidad de metabolizar la fructosa directamente a manitol (Lefeber *et al.*, 2011).

2.5.6.7 Ácidos carboxílicos

Los ácidos cítrico, acético y láctico desempeñan un papel importante en el desarrollo del carácter del chocolate, permitiendo la activación de las enzimas del grano de cacao implicadas en la producción de aminoácidos libres, péptidos y azúcares reductores. La producción de ácido acético a niveles del 1-2 % se considera ideal para detener la vida vegetativa del embrión.

2.5.6.8 Pirazinas

Las pirazinas son compuestos volátiles que favorecen al sabor del chocolate después del tostado. Se forman durante el tostado por las reacciones entre azúcares reductores y aminoácidos libres (Afoakwa *et al.*, 2008; Hashim *et al.*, 1998), la concentración de aminoácidos libres aumenta durante la fermentación y contribuye a la actividad de las proteasas, que degradan las proteínas de almacenamiento con el consecuente incremento de la cantidad de aminoácidos hidrofóbicos como la fenilalanina, leucina y tirosina.

2.5.6.9 Alcoholes superiores, ésteres, aldehídos y cetonas

Ho *et al.* (2014) informaron que durante la fermentación del grano de cacao, la concentración de alcoholes superiores aumenta, encontrándose entre los principales alcoholes el alcohol feniletílico (81.5 % del total), el alcohol isoamílico (10.8 %) y el 2-metil-1-butanol (4.2 %), también se observó un aumento de los ésteres: acetato de fenilo (49.7 %), acetato de etilfenilo (19.7 %), hexanoato de etilo (10 %), octanoato de etilo (8.7 %) y acetato de isoamilo (7.5 %), probablemente debido al metabolismo de las levaduras. En cuanto a los aldehídos, al inicio de la fermentación los niveles de aldehídos eran poco detectables, sin embargo, tendieron a aumentar sus niveles, identificándose cuatro principales: acetaldehído fenilo (47 %, 46 %), benzaldehído (3.3 %, 31 %), nonanal (15 %, 18%) y hexanal (6 %, 4.8 %), sin embargo, éstos se perdieron durante el secado y tostado, en lo que se refiere a las cetonas el comportamiento fue el contrario, se detectaron niveles significativos en la pulpa sin fermentar disminuyendo de 2 a 5 veces más durante la fermentación, las principales cetonas detectadas en el mucílago fueron 2-heptanona (49 %, 26 %), acetofenona (28 %, 43%), benzotiazol (17.5 %, 17 %) y 2-nonanona (5 %, 13.5 %).

Hasta ahora, se han desarrollado investigaciones sobre algunos de los compuestos identificados en el cacao fermentado, secado, tostado y/o en el producto final (chocolate) como se menciona en este apartado, utilizando métodos tradicionales como la fotometría (Folin-Ciocalteu, método Bradford) y técnicas cromatográficas acopladas a detectores como: HPLC–UV, HPLC–RI, HPAEC–PAD utilizados principalmente para el análisis de ácidos carboxílicos y GC-FIT para la identificación de compuestos volátiles, en general estos tipos de análisis se restringen a la cuantificación individual o de un número limitado de compuestos, razón por la cual, a pesar del gran número de compuestos volátiles y no volátiles que existen en el cacao, los estudios reportan muy poca información sobre los cambios que se realizan en cada etapa de procesamiento sobre el perfil de metabolitos. En este sentido, la aparición de nuevas tecnologías analíticas, incluyendo las ciencias "ómicas", abre la posibilidad de obtener información a gran escala, permitiendo una visión global de los procesos biológicos.

2.6 Metabolómica

Las “ómicas” son las ciencias que permiten estudiar un gran número de moléculas, implicadas en el funcionamiento de un organismo (Frigolet & Gutiérrez-Aguilar, 2017). El sufijo “ómica” significa masa o muchos y se refiere al estudio de la totalidad o conjunto de algo de manera global (Mozzi *et al.*, 2013), se utiliza para diferenciar los estudios que implican un gran número de características de una muestra biológica, así, para el estudio de los genes, se ha desarrollado la genómica, la transcriptómica, la proteómica y la metabolómica. La Figura 2.13 muestra el esquema general del dogma central de la biología molecular y la integración de las diferentes ómicas, en el que se observa la unidireccionalidad en la expresión de la información contenida en los genes de las células, que se transcribe como ARNm (mensajero) y posteriormente se traduce en proteínas, y su relación con otras moléculas como: lípidos, carbohidratos, aminoácidos, nucleótidos, entre otros.

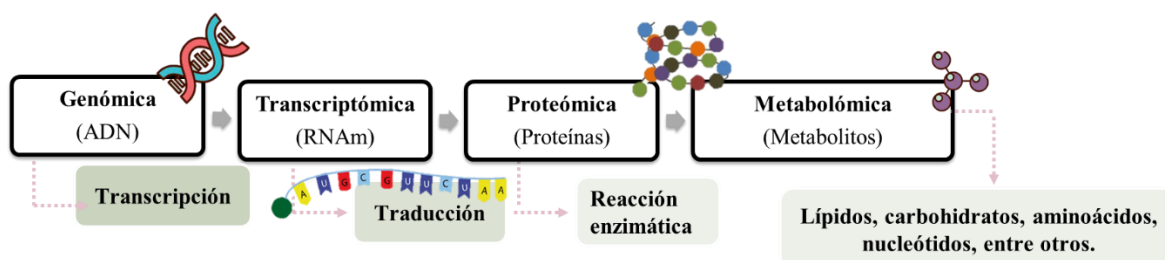


FIGURA 2.13 Esquema general del dogma central de la biología molecular y la integración ómica.

El avance de la tecnología ha propiciado el desarrollo de sofisticados instrumentos analíticos que permiten la identificación y medición de una gran variedad de moléculas, lo que, unido a los avances de la informática, ha facilitado el análisis de una gran cantidad de información de forma simultánea, permitiendo así el auge de las llamadas "ciencias ómicas".

La metabolómica es la más reciente de las denominadas ciencias "ómicas"; por analogía con las otras ómicas, se ocupa de la caracterización y el análisis cuantitativo de los metabolitos intracelulares presentes en una muestra biológica, comúnmente definidos como

compuestos de baja masa molecular < 1500 Da (Wishart, 2008; Mozzi *et al.*, 2013), que, en su totalidad, conforman el metaboloma (conjunto completo de pequeños compuestos como metabolitos intermedios, hormonas, moléculas de señalización y metabolitos secundarios, que se encuentran en un organismo vivo, ya sea animal o vegetal, en un momento dado).

Estas pequeñas moléculas pueden incluir una amplia variedad de compuestos endógenos y exógenos como aminoácidos, ácidos nucleicos, carbohidratos, ácidos carboxílicos, vitaminas, compuestos fenólicos, alcaloides, minerales y cualquier otro que pueda ser utilizado, ingerido o sintetizado por una célula u organismo dado. Los metabolitos endógenos pueden clasificarse en primarios y secundarios. Los primeros son los productos del metabolismo generados durante la fase de crecimiento de un organismo para realizar funciones fisiológicas y apoyar el desarrollo celular. Por otro lado, los metabolitos secundarios no tienen una función directa con el crecimiento y el mantenimiento de las funciones celulares y son productos finales del metabolismo primario.

A diferencia de los análisis tradicionales, que se centran en el estudio de uno o unos pocos componentes de una muestra, la metabolómica pretende estudiar simultáneamente el mayor número posible de metabolitos en un momento concreto del metabolismo (Figura 2.14). Para ello, la metabolómica implica el conocimiento de varias disciplinas científicas, como la ingeniería electrónica para el procesamiento de señales espectrales, la química analítica y orgánica para la detección y caracterización de metabolitos, la bioestadística para el procesamiento de datos y la bioquímica para la interpretación biológica de los datos. Por lo tanto, la metabolómica se ha convertido en una herramienta importante en muchas disciplinas, como la medicina, la nutrición y la agricultura.

Dada la complejidad de este tipo de estudios y la gran variedad de metabolitos existentes en los sistemas biológicos, han surgido diferentes subdisciplinas de la metabolómica centradas en un grupo específico de metabolitos, como la lipidómica, centrada en el estudio de la fracción lipídica de una muestra, o en un tipo específico de estudio como la nutrimetabolómica, la xenometabolómica, la metabolómica microbiana, la

farmacometabolómica, la metabolómica ambiental, la cardiometabolómica, la secretómica, la cosmetabolómica, entre otras.

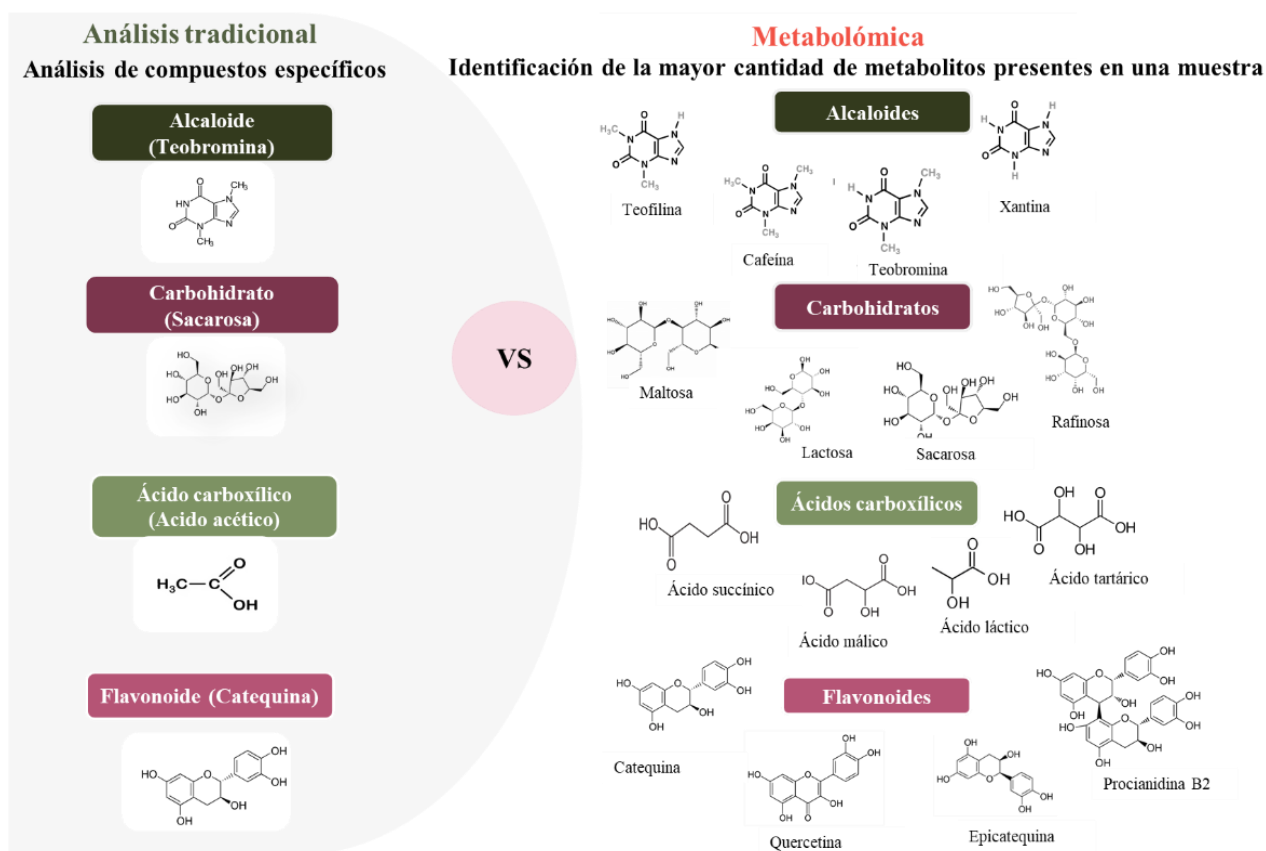


FIGURA 2.14. Comparación entre el análisis tradicional y el análisis metabolómico.

La metabolómica se ha convertido en una herramienta importante en muchas disciplinas, como la medicina, la nutrición y la agricultura. Se ha utilizado para evaluar métodos de extracción y desarrollar métodos analíticos basados en el uso de plataformas analíticas, que permiten obtener la mayor información posible de la muestra, en la ciencia de los alimentos se ha aplicado para el aseguramiento de la calidad, durante el procesamiento, la seguridad de las materias primas y los productos finales (Cevallos-Cevallos *et al.*, 2009). Entre algunos ejemplos, Capote *et al.* (2007), desarrollaron un método analítico basado en el análisis cromatográfico y modelos quimiométricos para la identificación de adulterantes en aceite de oliva. Ledesma-Escobar *et al.* (2019) estudiaron los compuestos bioactivos durante

la maduración de limón persa (*Citrus latifolia*), concluyendo que, de los 107 metabolitos identificados tentativamente, los azúcares, ácidos carboxílicos y compuestos volátiles fueron los que sufrieron los cambios más significativos entre las etapas de crecimiento del fruto. También se ha utilizado para la caracterización exhaustiva de los metabolitos presentes en los residuos agronómicos como las hojas, las aguas residuales y el orujo, que resultaron ser una rica fuente de fenoles con propiedades antioxidantes (Peralbo-Molina *et al.*, 2012).

En función del tipo de análisis, el análisis metabolómico puede dividirse en dos grupos principales, análisis no dirigido y análisis dirigido (Fiehn, 2002):

(I). *Análisis no dirigido* (metabolómica global): Se basa en la caracterización del mayor número posible de metabolitos de diversas familias químicas contenidos en muestras biológicas (Theodoridis *et al.*, 2008). La detección de este amplio abanico de metabolitos requiere generalmente el uso de más de una plataforma analítica, entre las que destacan las basadas en la espectrometría de masas usualmente acoplada a métodos de separación como la cromatografía de gases (GC), la cromatografía líquida (LC) o la electroforesis capilar (CE), con el fin de obtener un perfil lo más completo posible del metaboloma (Dettmer *et al.*, 2007; Gorrochategui *et al.*, 2016). Dada su complejidad y la limitación para obtener estándares analíticos para todos los metabolitos identificados, estos estudios suelen presentar las cuantificaciones en términos relativos; sin embargo, es muy útil en el desarrollo de bases de datos y en los análisis discriminativos, que se discutirán más adelante.

(II). *Análisis dirigido*: Se centra en el estudio cualitativo y cuantitativo de un grupo específico de metabolitos, es decir, evalúa el comportamiento de un grupo definido de compuestos en una muestra bajo determinadas condiciones. Este tipo de análisis se caracteriza por una alta sensibilidad y selectividad de los metabolitos analizados y, por tanto, requiere un mayor nivel de extracción y purificación de los metabolitos, para lo cual es necesaria una preparación selectiva de la muestra en función de la naturaleza y abundancia de los metabolitos (Mozzi *et al.*, 2013; Myint *et al.*, 2009). Particularmente este tipo de análisis se ha desarrollado utilizando espectrómetros de masas de triple cuadrupolo (QqQ) y suele ser consecuencia de un análisis previo no dirigido, que permite definir los compuestos o la familia de compuestos a determinar.

(III). Huella dactilar metabólica: Es un método rápido y de alto rendimiento para el análisis cualitativo de muestras biológicas mediante análisis multivariante (Kosmides *et al.*, 2013). Puede utilizarse para clasificar las muestras en función de su procedencia, relevancia u origen biológico, utilizando la tecnología adecuada, es decir, es rápido, pero no da necesariamente información selectiva y mucho menos específica de los metabolitos (Cevallos-Cevallos *et al.*, 2009).

Además, dependiendo del objetivo específico del estudio, el análisis metabolómico puede clasificarse como (Cevallos-Cevallos *et al.*, 2009b; Wishart, 2008):

(I). Discriminativo: Este tipo de análisis se utiliza cuando el objetivo del estudio es la discriminación entre grupos de muestras y se basa en el análisis multivariante de datos, como el análisis de componentes principales (PCA), que es uno de los más utilizados para este fin.

(II). Informativo: Su función principal es la elaboración y actualización de bases de datos de metabolitos.

(III). Predictivo: Su objetivo es la predicción de variables difíciles de medir directamente a partir del perfil de metabolitos y su abundancia, para lo cual la regresión por mínimos cuadrados parciales (PLS) es una de las herramientas más utilizadas.

2.6.1 Proceso general del análisis metabolómico

El proceso analítico de la metabolómica, en términos generales, consiste en una secuencia de pasos experimentales que incluyen: el muestreo, la preparación de la muestra, la separación, la detección, el procesamiento de los datos y el análisis estadístico. La Figura 2.15 ilustra el proceso general del análisis metabolómico; es importante señalar que la selección de los pasos depende de la naturaleza de la muestra y del tipo de estudio que se realizará. Sólo la detección y el análisis de datos han sido pasos esenciales en todos los estudios de metabolómica reportados.

En la metabolómica, un experimento comienza con la selección del material biológico y el muestreo. Se debe de disponer de un número suficiente de muestras para someter los

datos a un análisis estadístico que garantice la representatividad, y el muestreo debe ser no invasivo (Alvarez-Sánchez *et al.*, 2010).

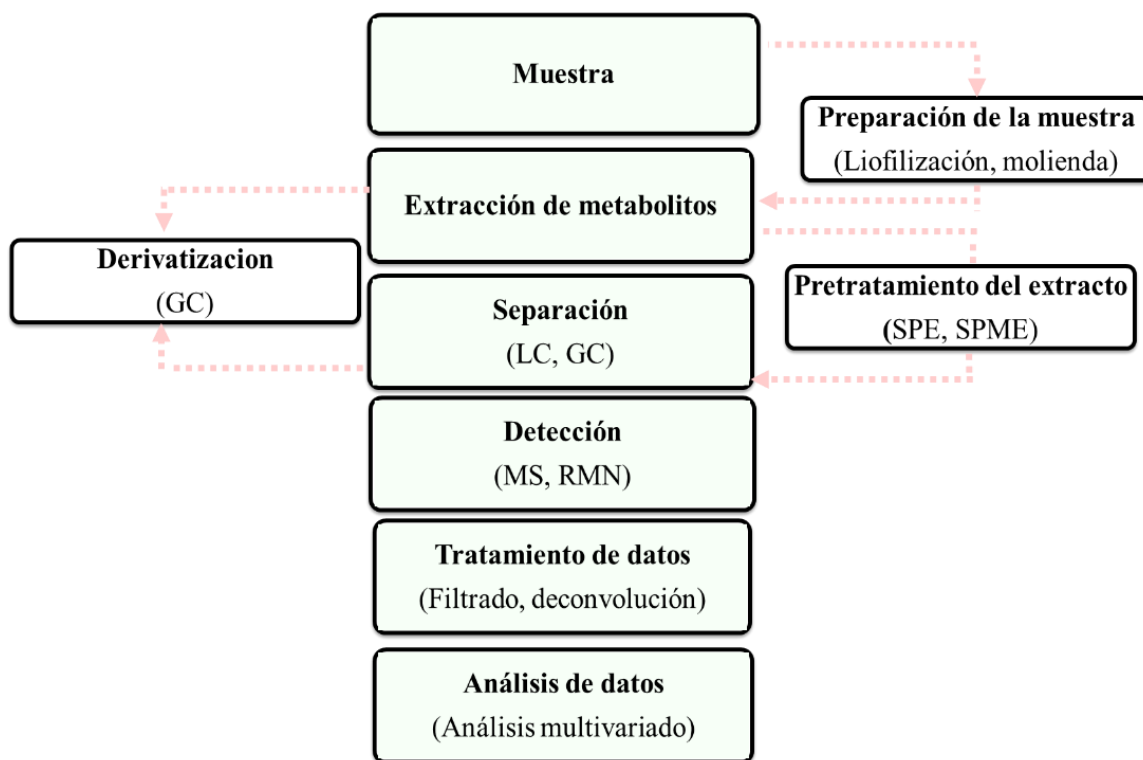


FIGURA 2.15. Esquema general del proceso de análisis metabolómico.

2.6.1.1 Muestreo y preparación de muestras

La preparación de las muestras depende de la estrategia seleccionada y de la plataforma analítica, el método de preparación de la muestra debe ser simple, robusto y capaz de preservar la integridad de los metabolitos (Fiehn *et al.*, 2007), generalmente, el muestreo de materiales vegetales requiere un cuidado especial, debido a los cambios en la degradación enzimática o la oxidación, que podrían afectar los resultados. Por esta razón, el muestreo y la preparación de la muestra deben realizarse rápidamente. La congelación con nitrógeno líquido es la forma más utilizada, ya que favorece la rápida inactivación de las reacciones enzimáticas (Carpenter *et al.*, 1993); la liofilización se considera como un segundo paso que puede ayudar a estabilizar las muestras congeladas ya que protege contra las actividades

enzimáticas y microbianas, así como la descomposición durante el almacenamiento. Se ha determinado que, para las muestras sólidas, a la molienda, típicamente con nitrógeno líquido, le sigue la liofilización que actúa como un paso de concentración y minimiza las posibles diferencias entre los metabolitos debido a las diferencias en el contenido de humedad entre los grupos de muestras; la molienda mejora la liberación de metabolitos durante la extracción, sin embargo, una de las desventajas es que puede causar la pérdida de metabolitos volátiles (Muccio y Jackson, 2009).

La extracción de los metabolitos de interés es un paso crucial que depende de la estrategia metabolómica seleccionada y del tipo de muestra. El tipo de extracción debe ser cuidadosamente seleccionada para obtener los resultados esperados, la extracción está orientada a liberar ciertos metabolitos de la muestra de manera eficiente, evitar sustancias que puedan interferir con el análisis, hacer el extracto compatible con el equipo analítico, y si es necesario maximizar la cantidad y concentración de los compuestos de interés (Alvarez-Sánchez *et al.*, 2010). En la metabolómica no dirigida, la naturaleza de los compuestos de interés (tantos como sea posible) es muy amplia, por lo que deben probarse y compararse diversos disolventes y métodos de extracción entre grupos de muestras. En la mayoría de los casos, los disolventes orgánicos polares, como el metanol, las mezclas de metanol y agua o el etanol, y los disolventes no polares, como el cloroformo, son los más utilizados para extraer exhaustivamente los componentes, debido a su capacidad para extraer compuestos hidrofílicos o hidrofóbicos.

Se han realizado estudios en cacao desde un enfoque no dirigido, Mayorga-Gross *et al.*, (2016) realizaron extracciones (sólido-líquido) utilizando acetona:agua:ácido acético (70:29.5:0.5) con agitación y centrifugación; en su mayoría, los compuestos extraídos fueron flavonoides: epicatequina, procianidinas y antocianinas; y oligopéptidos de 3 a 12 aminoácidos. En general, la mayoría de los estudios en cacao han tenido por objetivo la identificación y caracterización de compuestos volátiles, los cuales están relacionados con atributos de aroma que pueden ser considerados como marcadores sensoriales de notas positivas como son: 2,3-butanediol, 2,3-dimetilpirazina, 3-metil-1-butanol y 2-feniletanol (Assi-Clair *et al.*, 2019; Koné *et al.*, 2016). La extracción de compuestos volátiles se realiza

principalmente utilizando un dispositivo de espacio de cabeza (HS), a veces acoplado a la microextracción en fase sólida (SPME), los compuestos volátiles se separan fácilmente de la muestra (ya sea sólida o líquida) por calentamiento y se analizan por GC–MS (Sweetlove y Fernie, 2013; Wang y Jones, 2014). A veces, se incluye el paso de derivatización cuando los metabolitos se van a separar por GC y no son lo suficientemente volátiles; pero también se puede utilizar para aumentar la estabilidad, la selectividad o la sensibilidad de los metabolitos.

2.6.1.2 Plataformas analíticas en metabolómica

Las plataformas más utilizadas para el análisis metabolómico son: las basadas en espectrometría de masas (GC–MS y LC–MS) y RMN. Debido al elevado número de metabolitos en cualquier muestra biológica, es necesario recurrir a métodos de separación de los componentes para su posterior detección. La separación tiene como objetivo mejorar la sensibilidad y el poder de resolución del análisis, así como proporcionar información adicional, tiempo de retención (t_R) que facilite la identificación de los metabolitos. Las técnicas de separación más utilizadas en metabolómica son la GC y la LC.

La GC es una técnica que permite separar los compuestos volátiles, como los aromáticos y los que pueden volverse volátiles por derivatización, que depende de la estructura química de los metabolitos objetivo, generalmente este paso es imprescindible para metabolitos de familias como los aminoácidos, los ácidos grasos, los ácidos carboxílicos o los carbohidratos. Por otro lado, en la separación por LC, la selección de la fase móvil y la columna analítica son determinantes en el nivel de separación (Theodoridis *et al.*, 2008).

En metabolómica es fundamental el uso de detectores con alta sensibilidad y amplio rango en la detección de metabolitos, aun si estos se encuentran en concentraciones bajas en matrices complejas (Potts & Potts, 1987; Cubero-Leon *et al.*, 2014). Los detectores más utilizados son MS y RMN, sin embargo, en este apartado solo se describirán las generalidades de la MS, que es la técnica que se usará durante el desarrollo de esta Tesis. Este tipo de detectores se basa en el movimiento diferencial de las moléculas ionizadas a través del vacío

mediante la administración de un campo eléctrico. A partir de la entrada de la muestra, ésta se ioniza, el analizador de masas separa los iones según su relación masa-carga (m/z), y el detector produce una corriente eléctrica a partir de los iones incidentes que es proporcional a su abundancia, y constituye la señal recogida (Dettmer *et al.*, 2007).

El tipo de fuente de ionización requerida depende en gran medida de la naturaleza de los metabolitos que se van a analizar. Las fuentes de ionización dependen del tipo de separación (GC o LC), por lo que las más comunes en metabolómica son la ionización de impacto electrónico (EI) y ionización química (CI) utilizadas en GC-MS, mientras que la ionización electrospray (ESI) y la ionización química a presión atmosférica (APCI) se emplean en LC-MS. Para los fines de esta tesis, a continuación, se explican las fuentes de ionización por impacto de electrones y de electrospray, utilizados para los análisis descritos en los objetivos.

(I). Ionización por impacto de electrónico (EI): La muestra en fase gaseosa entra en la fuente de ionización desde el GC. Las moléculas se cargan positivamente al interactuar con un haz de electrones generado en un filamento metálico calentado a altas temperaturas. El impacto de los electrones sobre las moléculas volátiles puede dar lugar simplemente a la generación de un ion positivo o a la ruptura en fragmentos más pequeños con carga positiva. Por lo general, se utilizan electrones con una energía de 70 V, lo que da lugar a una fragmentación significativa, que permite obtener un espectro de masas.

(II). Ionización por electrospray (ESI): Se basa en la aplicación de un campo eléctrico sobre un líquido nebulizado, procedente del LC, que contiene un agente ionizante como un ácido débil o una sal, generando los iones que serán analizados en el detector de masas.

Los analizadores de masas se caracterizan por: (I) la precisión de masa de los m/z medidos, relacionada con el poder de resolución de masa y la estabilidad del instrumento; (II) el poder de resolución para proporcionar un valor específico de resolución de masa; (III) el rango de masa o los límites de m/z dentro de los cuales un MS puede detectar iones u operar para registrar un espectro de masa; (IV) la eficiencia de transmisión o relación entre el número de iones que llegan al detector y el número de iones que salen del analizador de masas, relacionada con la sensibilidad del MS. Sin embargo, para obtener mejoras

significativas en términos de mayor precisión de masa y deconvolución de picos superpuestos, los analizadores de masas pueden utilizarse solos o combinados con el mismo o con diferentes tipos de analizadores de masas [instrumentos de MS híbridos o en tándem (MS/MS)].

Según el tipo de análisis metabolómico (análisis no dirigido o dirigido), se utilizaron diferentes analizadores de masas: Orbitrap, Q-Orbitrap, Triple cuadrupolo (QqQ:), Tiempo de vuelo (TOF); Cuadrupolo tiempo de vuelo (QTOF) (Castro-Puyana y Herrero, 2013), este último es el que se utilizará en el desarrollo de esta Tesis y se explica a continuación:

El detector de masas híbrido cuadrupolo-tiempo-de-vuelo (QTOF) es comúnmente utilizado para el análisis metabolómico no dirigido, en comparación con el TOF y el QqQ, ofrece una mejor selectividad y una alta resolución de masas, permitiendo una identificación altamente fiable, gracias a una alta precisión de masa (por debajo de 2 ppm). Este tipo de detectores puede operar en modo MS con el TOF alcanzando una mayor precisión de masa o en modo MS/MS para la elucidación estructural, este último tiene la particularidad de proporcionar, además del espectro de masas, la masa del ion del que procede el espectro, que analizando las características espectrales (ion precursor, iones producto, pérdida de masa neutra, formación de aductos), permiten la identificación mediante bases de datos adecuadas, sin necesidad de estándares. En la Figura 2.16 se muestra un esquema general de un detector QTOF. El funcionamiento implica que, las moléculas ionizadas procedentes de la fuente de ionización, se introducen en el analizador de masas QTOF mediante alto vacío y un diferencial de potencia eléctrica a través de un tubo capilar, que en su extremo tiene un dispositivo de forma cónica llamado "*skimmer*", que ayuda a centrar las entidades moleculares que entran en el detector de masas. Una vez pasado el *skimmer*, las entidades moleculares avanzan a través de un octopolo, que alinea las entidades antes de llegar al primer cuadrupolo que filtrará las masas de las entidades moleculares según el rango de m/z seleccionado. Las entidades moleculares que cubren el rango de m/z a estudiar entran entonces en una célula de colisión donde son fragmentadas por un "bombardeo" de átomos de nitrógeno. Los fragmentos obtenidos pasan a un segundo cuadrupolo donde de nuevo se filtran las masas dejando sólo las que cumplen con un rango de m/z determinado. Finalmente,

las entidades moleculares y/o sus fragmentos entran en el analizador de tiempo de vuelo, donde, mediante la ecuación de energía cinética, se calcula la masa de las diferentes entidades moleculares, utilizando iones de masa conocida como referencia. Los fragmentos procedentes del tiempo de vuelo impactan en un multiplicador de electrones que produce las señales que, mediante un módulo de recogida de datos, se convertirán en los espectros de masas de cada entidad molecular (Ledesma-Escobar, 2016).

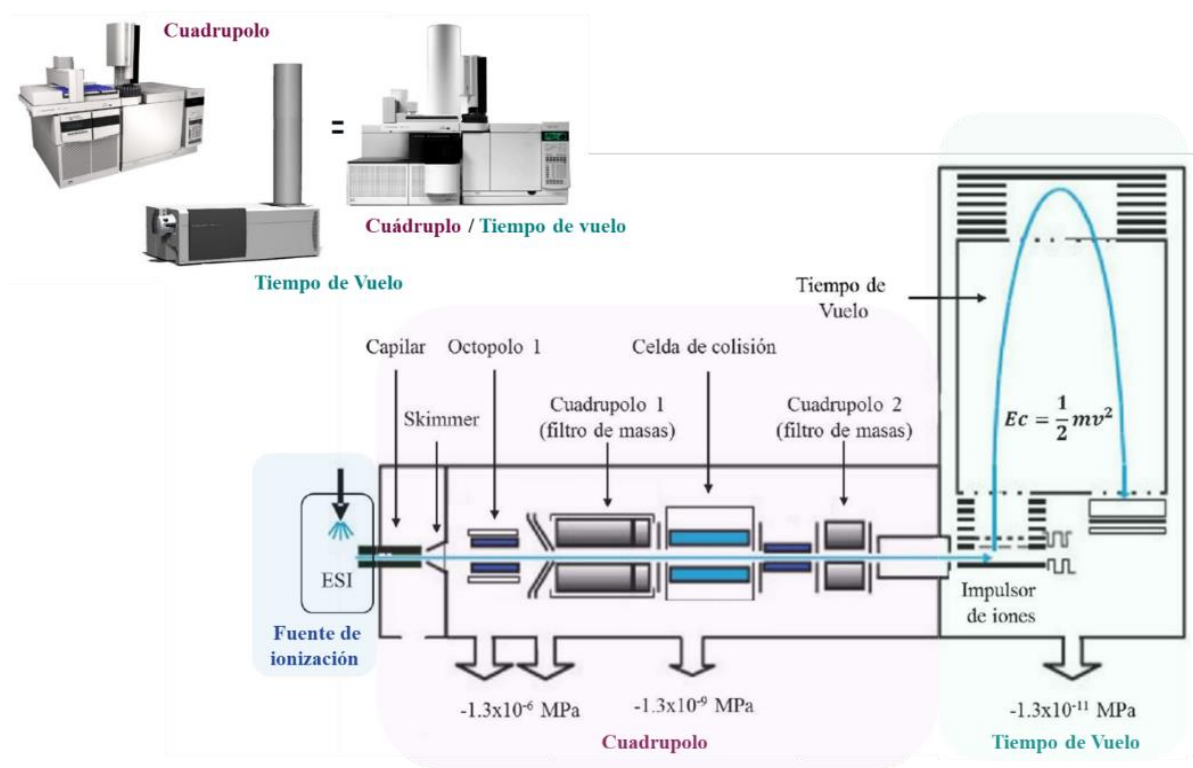


FIGURA 2.16 Esquema general del espectrómetro de masas híbrido cuadrupolo-tiempo de vuelo

2.6.1.3 Tratamiento y análisis de datos en metabolómica

Después de la detección, el siguiente paso es el tratamiento de los datos seguido del análisis estadístico. La metabolómica se caracteriza por tratar con una gran cantidad de datos, la quimiometría es una disciplina química que utiliza la estadística y los métodos matemáticos como herramientas para proporcionar la máxima información química relevante mediante el análisis de datos químicos (Kosmides *et al.*, 2013). El primer paso es el pre-tratamiento de los datos, consiste en transformar los datos "brutos" proporcionados por el

instrumento en datos limpios que puedan ser procesados por cualquier software de tratamiento de datos. Éste incluye:

(I). Filtrado de datos: Generalmente en análisis metabolómico no dirigido, cuando se obtiene una gran cantidad de datos, el filtrado se considera un paso obligatorio para eliminar las señales no deseadas (ruido químico).

(II). Deconvolución: Es un algoritmo que permite resolver *in silico* picos superpuestos sin previo conocimiento de los compuestos, basado en sus espectros de masas (Ledesma-Escobar, 2016), es decir, permite separar dos o más picos cromatográficos correspondientes a entidades moleculares diferentes, que aparecen en tiempos de retención tan cercanos que sus fragmentos iónicos causan interferencia entre ellos y determina si los fragmentos corresponden al mismo compuesto o si son diferentes.

(III) Integración y alineación del pico: La alineación de señales se realiza a partir de los tiempos de retención y los espectros de masas de cada entidad, permitiendo agrupar las muestras que corresponden a los mismos metabolitos.

(IV) Identificación de metabolitos: Para realizar la identificación tentativa de metabolitos, en GC–MS la base de datos más utilizada en muestras de origen vegetal es Mass Spectral Library del U.S. National Institute of Standards and Technology (NIST), a pesar de no contener información de alta resolución, la identificación puede completarse con el índice de retención (IR), calculado por el análisis de una mezcla de hidrocarburos lineales (Fiehn, 2016). En cuanto a LC–MS, existe una mayor variedad de bases de datos, a pesar de que la identificación no es exhaustiva, el uso de la información MS/MS permite una identificación más precisa, entre las bases de datos más comunes para muestras biológicas se encuentran METLIN, MassBank y HMDB por mencionar algunas.

(V). Normalización: Tiene como objetivo eliminar la variación no deseada entre muestras permitiendo su comparación cuantitativa (Katajamaa & Orešič, 2007), la elección del método de normalización depende del material biológico y de la plataforma analítica (Wu & Li, 2016).

Una vez completados estos pasos, se obtiene una matriz de datos adecuada para realizar los análisis multivariantes pertinentes. Para analizar las diferencias entre las muestras, se utilizan técnicas de análisis multivariante de datos (MVDA) para la visualización y el análisis exploratorio; el análisis de componentes principales (PCA) es uno de los más utilizados (Hotelling, 1933), consiste en buscar combinaciones lineales de las variables originales que representen la mayor variabilidad posible de los datos. Tras este tipo de análisis, se utilizan pruebas estadísticas univariantes, como el test de Tukey, para identificar las variables relevantes tras el análisis exploratorio. Una vez que se ha identificado el conjunto de metabolitos de interés y se ha enriquecido mediante el análisis estadístico, la interpretación de las vías metabólicas continúa para buscar los mecanismos bioquímicos subyacentes y su influencia en el fenotipo y la fisiología del objetivo de estudio.

En la actualidad, el análisis metabolómico se utiliza en una variedad de estudios más allá del estudio del metabolismo, por ejemplo, para la identificación de adulteraciones o contaminantes en una muestra, su clasificación según sus características (origen geográfico, variedad, tipo de producción) o en la mejora de operaciones como la extracción, entre otras aplicaciones.

2.6.2 Estudios de metabolómica en alimentos fermentados

La aplicación de la metabolómica en los alimentos fermentados se utiliza para monitorizar los cambios en los metabolitos durante la fermentación, permitiendo un mejor seguimiento del proceso, lo que puede repercutir positivamente en la calidad sensorial y nutricional del producto final fermentado. A continuación, se muestran algunos ejemplos de alimentos fermentados en los que se ha aplicado la metabolómica:

Se ha aplicado la metabolómica en quesos y vinos para crear modelos sensoriales predictivos. Generalmente, la caracterización sensorial se realiza con pruebas de evaluación sensorial, para las que hay que entrenar al personal para que describa los diferentes atributos sensoriales de la muestra. Una de las alternativas es el estudio de los metabolitos. Ochi *et al.* (2012) analizaron muestras de quesos producidos en diferentes países y procesos de

fabricación, los resultados indicaron que el ácido aspártico, la isoleucina, la asparagina, el ácido 4-aminobutírico, el ácido láctico y la ornitina son contribuyentes positivos, mientras que la lactosa, el triptófano, la prolina y el ácido succínico contribuyeron negativamente. Por otro lado, Rochfort *et al.* (2010) analizaron diferentes muestras de vino de distintas variedades de uva (Cabernet, Sauvignon y Shiraz) y grados de exposición a la luz solar; la principal diferenciación se debió a las concentraciones de prolina, azúcares (glucosa y fructosa), metanol, succinato, acetato y algunos aminoácidos alifáticos, los vinos más expuestos a la luz solar mostraron menores concentraciones de etanol y mayores de glicerol, acetato, ácido málico, azúcares y aminoácidos, mientras que los vinos en sombra se caracterizaron por una menor astringencia y un ligero aumento del amargor.

En cacao, Mayorga-Gross *et al.* (2016) informaron de un análisis metabolómico destinado a supervisar los cambios que se producen durante el proceso de fermentación de 3 cultivares de cacao Trinidad y Tobago, Costa Rica y un clon IMC-67 de Upala, sometidos a fermentaciones endógenas. El análisis de los datos puso de manifiesto diferencias significativas entre los tres períodos de fermentación evaluados (0-2, 3-4 y 5-6 días), respectivamente. Se observó que, en general, los flavonoides y los azúcares tendían a disminuir a lo largo de la fermentación, mientras que la mayoría de los oligopéptidos aumentaban hasta alcanzar niveles máximos a los 3-4 días de fermentación y disminuían a partir de entonces. Estos resultados abren la puerta a estrategias para optimizar la fermentación del cacao, así como para contribuir al desarrollo de nuevas alternativas para el procesamiento del cacao basadas en valores bioquímicos y funcionales, que posteriormente se reflejarán en el sabor del chocolate para lograr un producto final de alta calidad, destacando que aún se necesitan más estudios para conocer el comportamiento de otras fracciones de compuestos dentro de los granos de cacao.

JUSTIFICACIÓN

La fermentación del cacao es un proceso de carácter espontáneo y dependiente de la microbiota presente en el ambiente, lo que conduce a menudo a productos de calidad variable. Si bien ya se conoce el rol de los microorganismos y el papel que juegan en las fermentaciones tradicionales, en algunos países se han comenzado a aplicar consorcios iniciadores en lotes pequeños a manera de estudio, sin embargo, el análisis de su efecto sobre la formación de metabolitos se ha restringido al análisis de un número limitado de compuestos. Hasta el momento no se encuentra reportado un análisis exhaustivo sobre la producción de compuestos volátiles y no volátiles producidos por diferentes consorcios iniciadores durante la fermentación de un cultivar mexicano en volúmenes comerciales.

HIPÓTESIS

La fermentación del cacao modulada con consorcios iniciadores, permitirá mejorar y homogenizar la calidad final del cacao, viéndose reflejado en los metabolitos relacionados con el desarrollo de sabores y aromas positivos.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo general

Analizar los cambios en el perfil de metabolitos (análisis metabolómico) durante la fermentación de granos de cacao (*Theobroma cacao* L.) de un cultivar mexicano, modulada por consorcios iniciadores.

3.2 Objetivos particulares

- i. Estudiar los cambios microbiológicos y físico-químicos durante el proceso de fermentación de cacao modulada con diferentes consorcios iniciadores en volúmenes comerciales de cacao mexicano.
- ii. Evaluar los atributos sensoriales en licor de cacao previamente fermentado con consorcios iniciadores.
- iii. Identificar tantos metabolitos volátiles (GC-QTOF/MS) y no volátiles (LC-QTOF MS/MS) como sea posible mediante la comparación de los espectros MS y MS/MS obtenidos experimentalmente contra los contenidos en bases de datos públicas y propias del grupo de investigación.
- iv. Evaluar el efecto de la fermentación modulada por consorcios iniciadores en granos de cacao, sobre el perfil de compuestos volátiles, mediante GC-QTOF/MS y análisis multivariado.
- v. Analizar los cambios de la fermentación modulada con consorcios iniciadores en granos de cacao, sobre el perfil de compuestos no volátiles, mediante LC-QTOF MS/MS y análisis multivariado.

4 MATERIALES Y MÉTODOS

La metodología general de esta investigación se dividió en tres etapas experimentales. (I) Estandarización de los consorcios iniciadores, fermentaciones de cacao y determinación de los parámetros microbiológicos y fisicoquímicos de los granos; (II) evaluación sensorial del licor de cacao, obtenido tras la fermentación, secado, tostado y conchado y (III) análisis metabolómico (no dirigido) de los compuestos volátiles y no volátiles presentes durante la fermentación y postfermentación.

4.1.1 Levaduras y bacterias

Con base al conocimiento de los microorganismos que impactan positivamente en las fermentaciones endógenas de cacao como se mencionó en el apartado (2.5.3.4.1), se seleccionaron dos cepas comerciales *S. cerevisiae* var. *diasticus* 23 y *S. cerevisiae* 58 y cinco cepas autóctonas *S. cerevisiae* 120, *L. plantarum* 14, *L. fermentum* 16, *A. pasteurianus* 98, *A. tropicalis* 61, aisladas e identificadas molecularmente por Romero-Cortes (2011) de fermentaciones endógenas de cacao mexicano del municipio de Huimanguillo, Tabasco. Las características bioquímicas de las cepas se muestran en la Figura 4.1.

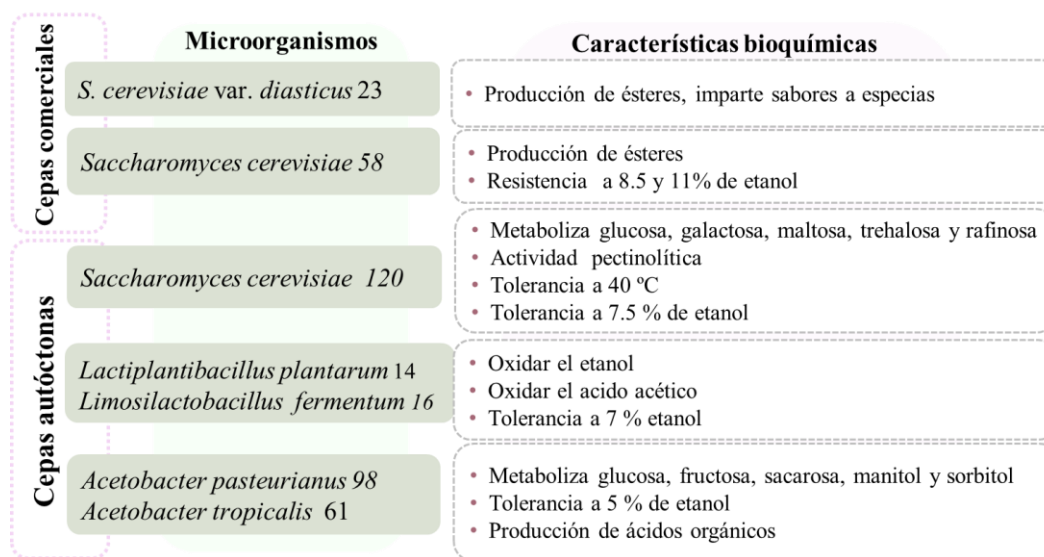


FIGURA 4.1 Características bioquímicas de las cepas de levaduras, BAL y BAA utilizadas en esta investigación.

4.1.2 Cinéticas de crecimiento en medio de cultivo de levaduras y bacterias

Se realizaron cinéticas de crecimiento para evaluar el comportamiento individual de cada cepa. Una alícuota de 100 μ L de cada microorganismo fue utilizada para inocular 10 mL en los siguientes medios de cultivo (**Anexo 8.1**): YPD (levaduras), MRS (BAL) y CARR modificado (BAA), se incubaron por 12 h a 25 °C las levaduras y a 37 °C las BAL y BAA. En matraces Erlenmeyer conteniendo 100 mL de caldo respectivo para cada cepa, se inoculó al 1 % (v/v) con cada suspensión de cepas activadas, se incubó a las temperaturas anteriormente mencionadas y se realizó la toma de muestra cada hora. Cada muestra fue medida a 600 nm en un espectrofotómetro (Biorad Smartspec® TM 3000).

4.1.3 Obtención y estandarización del concentrado celular

La biomasa microbiana se cosechó asépticamente, al tiempo en que los microorganismos alcanzaron su crecimiento máximo, por centrifugación repetida a 7000 rpm durante 20 min a 4 °C, se decantó el sobrenadante y se realizaron lavados con solución salina estéril (NaCl 0.85 % p/v) a fin de eliminar los restos de medio de cultivo. Con el objetivo de obtener una concentración celular de 1×10^9 - 10^{10} UFC/g, se estandarizó la relación de gramos de biomasa:agua peptonada estéril, suspendiendo diferentes cantidades de biomasa.

4.1.4 Protocolo de fermentación de los granos de cacao

El grano de cacao que se utilizó para esta investigación fue del cultivar Trinitario, en la cosecha de noviembre de 2018 los granos fueron adquiridos del centro de acopio de Aldama S.P.R. de R.L, en el municipio de Comalcalco y en la cosecha de abril de 2018 de obtuvieron de la beneficiadora Agrofloresta Productos de Mesoamérica en el municipio de Teapa, ambos ubicados en el estado de Tabasco, México. Las mazorcas se abrieron y se separaron de la placenta manualmente en las mismas plantaciones y la recepción de los granos de cacao en fresco y todos los ensayos de fermentación se llevaron a cabo en la División Académica de Ciencias Agropecuarias de la Universidad Juárez Autónoma de Tabasco.

Los granos frescos fueron trasferidos a cajas de madera de cedro de 0.08 m³, cada lote incluyo 120 kg de cacao fresco. Las fermentaciones se realizaron con y sin consorcio iniciador (testigo). Se formaron un total de cinco consorcios iniciadores con las levaduras y bacterias mencionadas en el apartado 4.1.5, la inoculación se realizó extendiendo sobre una primera capa de granos de cacao a unos 40 cm y el resto de la suspensión microbiana se añadió en la superficie, alcanzando una concentración de 10¹⁰ UFC/kg de cacao. La inoculación se realizó en concentraciones elevadas para garantizar el dominio competitivo sobre la microbiota nativa. Todas las cajas se cubrieron con hojas de plátano para atrapar el calor generado, los granos se voltearon cada 24 h con cubetas limpias, las muestras se recolectaron en un tiempo fijo cada 0, 6, 12, 24, 36, 48, 96, 120 y 144 h de las cuatro esquinas y centro a diferentes profundidades del cacao en fermentación.

4.1.4.1 Parámetros microbiológicos y físicos durante la fermentación

4.1.4.1.1 Viabilidad de los grupos de microorganismos

Las muestras de cacao se colectaron en condiciones asépticas en bolsas estériles, para ello, se mezclaron 10 gramos de cacao en 100 mL de solución de NaCl (0.85 %); la bolsa se colocó en un homogeneizador de palas (Interscience BagMixer 400CC, Canadá) por 120 s. A partir de esta solución se realizaron diluciones seriadas de 1 mL en agua peptonada al 0.1 % y se sembraron bajo el método de vaciado en placa, utilizando YPD para levaduras (28 ± 2 °C), MRS para BAL y CARR modificado para BAA, ambos medios se suplementaron con oxitetraciclina (0.25 mg/L) para inhibir el crecimiento de levaduras y se incubaron a 37 ± 2 °C. Para el recuento de colonias de UFC/mL se consideró un rango de 30 a 300 colonias por placa, el número de colonias obtenido se multiplicó por el factor de dilución y se obtuvo el Log10.

4.1.4.2 Evaluación de temperatura y pH

Los registros de temperatura se llevaron a cabo a través de un equipo Data Logger (JMI, U-TC, EUA) con canales de entrada de termopares tipo J para adquisición de temperatura, los cuales fueron colocados al centro de la caja. Los datos adquiridos fueron

visualizados y almacenados a través del software TracerDAQ en un equipo de cómputo Acer Aspire 5002WLMi.

El pH de la pulpa se determinó a partir de 10 gramos de cacao con pulpa diluidos en 100 mL de agua destilada en ebullición, se agitó durante 15 min, se filtró al vacío a través de papel filtro Whatman N° 4 (Senanayake *et al.*, 1997), una vez que el extracto alcanzó temperatura ambiente, se midió el pH con un potenciómetro (Hanna Instrument pH 213, EUA). Para medir el pH del cotiledón, se utilizaron 10 g de cacao en polvo diluido en 100 mL de agua destilada hirviendo con agitación por 15 min y se aplicó la metodología detallada para la medición del pH de la pulpa.

4.1.5 Procesos post-fermentativos (secado, tostado y conchado)

Después de la fermentación, los granos de cacao se secaron de forma natural exponiéndolos al sol separados del suelo de concreto por medio de lonas. Los granos de cacao se expusieron diariamente al sol de 9 a.m. a 5 p.m. y se removieron cada hora, durante el primer día. A partir del segundo día, la remoción de los granos de cacao se llevó a cabo cada 2 y 3 h hasta su resguardo y se terminó al alcanzar una humedad entre 6.5 y 7 %.

El proceso de tostado se realizó en un sistema de tambor rotatorio (Tostador Azteca 3 kg <http://mye100mex.com.mx>, México). El equipo contiene un cilindro con un sistema de rotación testigo a través de un variador de frecuencia, además de un sistema de medición que permite registrar la temperatura en la superficie y en el seno del cilindro. El tostado se llevó a cabo a 120 °C por 45 min. Los granos de cacao tostados se descascarillaron manualmente y los nibs se molieron (Retsch GM 200, Germany) con dos ciclos a 600 rpm por 30 s, una vez obtenida la pasta se refinó mediante conchado (Cocoatown, ECGC12SL, EUA) por 4 h. Las muestras colectadas al final del secado, tostado y conchado, fueron congeladas con nitrógeno líquido y almacenadas a -80 °C previo a su análisis.

4.1.5.1 Análisis físico del grano de cacao fermentado

Para efectos de clasificación del grano de cacao, una vez fermentado y seco se realizó la prueba de corte. La prueba de corte se realizó con una muestra representativa de 100 granos secos por réplica, con una guillotina especial (MAGRA 12k, Swiss) se realizaron cortes longitudinales de manera que los cotiledones quedaron expuestos en dos mitades. Esta prueba permite observar el grado de fermentación e identificar defectos como moho interno e infestación de insectos como se muestra en la Figura 4.2.



FIGURA 4.2 Clasificación del grano de cacao, basada en la prueba de corte.

4.1.6 Análisis sensorial de licor de cacao

Todos los licores de cacao derivados de las fermentaciones con granos de cacao inoculados y no inoculados (fermentaciones nativas, testigo) fueron analizados por panelistas con experiencia en la degustación de cacao y derivados. Las pruebas se realizaron en las instalaciones de la División de Ciencias Agropecuarias de la Universidad Juárez Autónoma de Tabasco. Las muestras fueron etiquetadas con tres dígitos al azar (Tabla 4.1), el licor de cacao se presentó en vasos de plástico de 10 mL que contenían aproximadamente 3.5 mL cada uno.

TABLA 4.1 Codificación de licores de cacao fermentados con consorcios iniciadores y con microbiota nativa (testigo).

Muestra	T1 (Testigo)	C4	T2 (Testigo)	C5	C6	C7	C8
Codificación	811	231	128	195	172	238	83

Los panelistas evaluaron las muestras identificando atributos positivos y negativos, siguiendo los criterios establecidos por el *Cocoa of Excellence Programme: CoEx-2017* (Tabla 4.2) en una escala ordinaria de 0-10, siendo 0 la calificación más baja y 10 la más alta.

TABLA 4.2 Atributos y defectos establecidos por el CoEx-2017, para la evaluación sensorial de los licores de cacao.

Atributos		Defectos	
Cacao	Vainilla	Mohoso	Verde/pizarroso
Nuez	Miel	Acético	Germinado
Uva pasa	Acaramelado	Láctico	Ácido
Frutos rojos	Dulzor	Podrido	Astringente
Melaza	Especias	Rancio	Amargo

4.1.7 Análisis del perfil de compuestos volátiles durante la fermentación del cacao

4.1.7.1 Preparación de la muestra

La composición de la fracción volátil se realizó con las muestras colectadas durante la fermentación, las cuales fueron pulverizadas con un molino para café (Krubs GX410011, Alemania), tamizadas a través de una malla N° 50 (tamices estándar ASTM) y desengrasadas siguiendo el procedimiento descrito por Mayorga-Gross *et al.* (2016), 5 g de cocoa se desengrasaron individualmente con 41.6 mL de hexano durante 20 min con agitación orbital (MaxQ™ 4000, EUA), seguido de centrifugación (Eppendorf 5810 R, Alemania) a 7000 x g durante 15 min; este proceso se repitió tres veces, el sobrenadante se decantó y se rotaevaporó (BUCHI heating bath B-490, México) por 10 min bajo condiciones de vacío.

4.1.7.2 Análisis de compuestos volátiles mediante HS–GC–QTOF/MS durante la fermentación de cacao

La extracción de compuestos volátiles se realizó a partir de 0.05 g de muestra de cocoa y 0.05 g de manteca de cacao, utilizando un automuestreador de espacio de cabeza (HS) (Agilent 7694E, EUA). Cada muestra se colocó en viales sellados herméticamente, con un tabique de silicona/politetrafluoroetileno (PTFE) para evitar la pérdida de volátiles. Las condiciones a las que se sometió fueron 30 min de equilibrio a 80 °C, el contenido de HS se analizó mediante cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas de alta resolución (GC– QTOF/MS) usando para la separación una columna capilar HP-5MS (30 m × 0.25 mm de diámetro interno, 0.25 µm de espesor de película) y helio (99.9 % pureza) como gas acarreador. La adquisición de datos se realizó en un rango m/z de 50-620. El tiempo total de análisis fue de 45 min.

4.1.7.3 Análisis de ácidos grasos mediante GC–MS durante la fermentación de cacao

El perfil de ácidos grasos (AG) de la manteca de cacao obtenida a partir de las muestras de cocoa en polvo, se analizó mediante GC-MS. Los ácidos grasos presentes en 0.05 g de muestra fueron derivatizados con el siguiente procedimiento, se saponificó con KOH 0.5 M seguido de transesterificación con MeOH, finalmente se extrajo la fracción de ácidos grasos usando hexano. Los ésteres de ácidos grasos se analizaron con un cromatógrafo de gases (Agilent 7890B, EUA) acoplado a un espectrómetro de masas (Agilent 5977A, EUA), para la separación, se usó una columna HP-5MS IU (30 m × 0.25 mm de diámetro interno, 0.25 µm de espesor de película), usando el siguiente programa de temperatura: 5 min a 120 °C; 5 °C/min hasta 300 °C (final). El tiempo total del análisis fue de 38 min.

4.1.7.4 Pre-tratamiento de datos obtenidos por GC–MS y GC–QTOF–MS

El pretratamiento de los datos obtenidos por GC–MS/QTOF–MS adquiridos con el software MassHunter Unknowns Analysis (Versión B.07.01), consistió en la remoción del ruido químico; la deconvolución según el algoritmo incluido en el software, considerando diferentes ventanas (25, 50, 75, 100 y 150); y la integración de los picos.

4.1.7.5 Identificación de compuestos volátiles y ácidos grasos

Los compuestos volátiles y los AG se identificaron mediante la coincidencia de espectros con la biblioteca NIST Mass Spectral Search Program v.11.0 (NIST, Washington, DC, EUA) así como la comparación del índice de retención lineal de cada compuesto con el estándar de la base de datos, la identificación provisional se asumió con más de un 75 % de similitud con los espectros reportados en la base de datos.

4.1.7.6 Análisis multivariado de los datos

Con los datos tratados se obtuvieron matrices con el área de los compuestos volátiles y de los ácidos grasos identificados. El porcentaje total por grupo compuesto se obtuvo normalizando por MSTUS, los datos de las áreas medias de todas las entidades identificadas. Para los análisis multivariados (MANOVA) se realizó el análisis estadístico por PCA, mapa de calor de análisis de clústeres y las diferencias significativas se determinaron mediante análisis univariado (prueba ANOVA y Tukey ($p \leq 0.05$) utilizando MetaboAnalyst 5.0 la transformación Z se aplicó al conjunto de datos sin procesar de ambas plataformas analíticas (GC-QTOF/GC-MS) para asegurarse de que todas las entidades tuvieran el mismo peso en el análisis, a pesar de que las transformaciones tienen un efecto de pseudoescalado, la matriz transformada en Z fue escalada por un método de autoescalado (media centrada dividida por la desviación estándar de cada variable), aplicado a todos los datos.

4.1.8 Análisis de compuestos no volátiles durante la fermentación de cacao

4.1.8.1 Extracción de metabolitos sólido-líquido por agitación

Los compuestos polares/semipolares se extrajeron de acuerdo al método previamente establecido por el grupo de investigación receptor para extractos vegetales. A partir de 0.2 g de muestra de cacao en polvo desengrasado como se describió en el apartado 4.1.7.1, se extrajeron los compuestos polares/semipolares utilizando 5 mL de extractante conformado por agua miliQ:cloroformo:acetona:metanol (10:10:10:70 %) y 5 ppm de hesperidina como estándar interno, mediante agitación a 900 rpm por 30 min (vibromatic, JPSELECTA). Los sobrenadantes se filtraron a través de una membrana Econofilter Nylon (Agilent, Technologies) 25 mm, 0.25 μ m. Los extractos se mantuvieron en congelación a -80 °C, previo a sus análisis.

4.1.8.2 Análisis de compuestos polares/semipolares mediante LC–QTOF MS/MS

La separación cromatográfica de los componentes del extracto se realizó utilizando un cromatógrafo de líquidos (LC, por sus siglas en inglés) Agilent de la serie 1200, provisto de una columna analítica Zorbax eclipse plus C18 (150 × 3.0 mm i.d., 1.8 μ partícula) con un flujo de 0.20 mL/min mediante el siguiente gradiente: 0 min 0 % B; 1 min 25 % B, 6 min 40 % B, 8 min 60 % B, 10 min 100 % B, 20 min 100 % B, utilizando como fase móvil (A) agua y (B) acetonitrilo-isopropanol (50-50 %), se utilizó ácido fórmico 0.1 % como agente ionizante. La detección se realizó mediante espectrometría de masas con un detector híbrido cuádruplo-tiempo de vuelo de alta resolución 6540 (LC–QTOF MS/MS; Agilent Technologies, Santa Clara, CA), equipado con una fuente de ionización electrospray (ESI) utilizando dos energías de colisión (20 y 40 eV) tanto en modo de ionización positiva como negativa bajo las siguientes condiciones: presión del gas nebulizador 40 psi, flujo y temperatura del gas de secado 12 L/min y 325 °C. Los voltajes del capilar, cuádrupolo, skimmer y octopolo fueron: 3500 V, 130 V, 65 V y 750 V respectivamente. La adquisición de datos se realizó en modo centroide para un rango de m/z de 100 y 1200.

4.1.8.3 Pre-tratamiento de datos obtenidos por LC–QTOF MS/MS

Se utilizó el software MassHunter Workstation software (version B6.00 Profinder; Agilent Technologies, Santa Clara, CA) para extraer las características moleculares potenciales (MF) de todos los conjuntos de datos. El algoritmo de extracción consideró la extracción recursiva tomando todos los iones por debajo de los 1000 puntos en modo positivo y negativo, respectivamente, se eliminó el ruido químico de fondo mediante la resta de MFs vinculados al blanco. En la formación de aductos durante la ionización, además de los iones $[M+H]^+$ y $[M-H]^-$, se incluyeron otras especies químicas Na^+ , Cl^- y $HCOO^-$. Las entidades se extrajeron de acuerdo a su tR e intensidad del vértice del pico cromatográfico y precisión de masa, luego se realizó la integración de las entidades en todos los análisis.

4.1.8.4 Identificación de metabolitos multivariado y análisis de datos

Se realizó la extracción de los espectros MS/MS de cada metabolito de la lista de entidades moleculares mediante el programa MassHunter Qualitative Data Analysis v.7.0 (Agilent Technologies), los cuales se compararon con la información contenida en las bases de datos publicas METLIN, MassBank de Norteamérica, así como en las bases de datos propias del grupo de investigación. El área de los metabolitos fue normalizada por MSTUS, los análisis multivariados se realizaron utilizando MetaboAnalyst 5.0, se aplicó a todos los datos la transformación logarítmica y el método de autoescalado (media centrada dividida por la desviación estándar de cada variable), posteriormente se realizó en análisis de componentes principales (PCA) y mapa de análisis de clústere

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1 Cinéticas de crecimiento en medio de cultivo de los microorganismos de los consorcios iniciadores

La Figura 5.1 muestra las cinéticas y los parámetros de crecimiento de *S. cerevisiae* 120, *S. cerevisiae* var. *diasticus* 23, *S. cerevisiae* 58, *L. plantarum* 16, *L. fermentum* 14, *A. tropicalis* 61 y *A. pasteurianus* 98 en sus respectivos medios de cultivo.

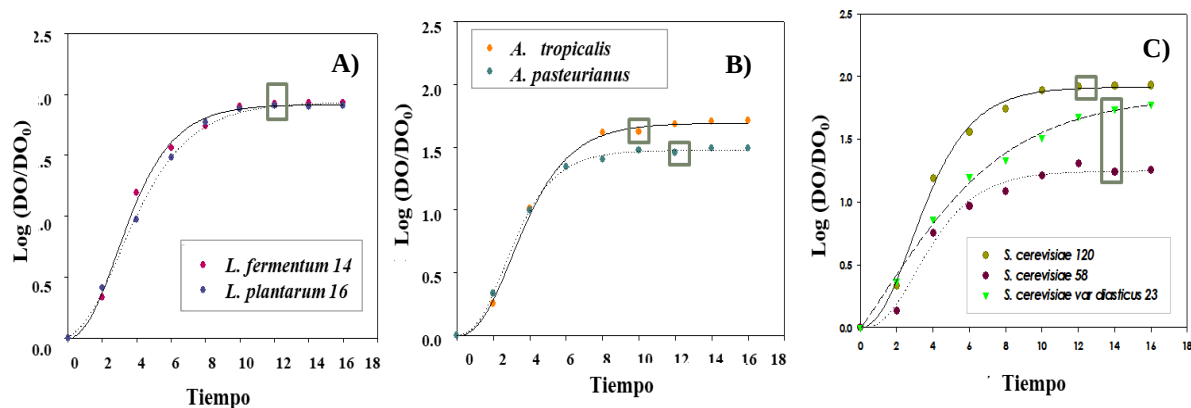


FIGURA 5.1 Parámetros y cinéticas de crecimiento de A) *L. plantarum* 14; *L. fermentum* 16; B) *A. pasteurianus* 98, *A. tropicalis* 61 y C) *S. cerevisiae* 120; *S. cerevisiae* 58; *S. cerevisiae* var. *Diasticus* en MRS (*Lactobacillus*), CARR (*Acetobacter*) y YPD (levaduras) a 37 °C (*Lactobacillus* y *Acetobacter*) y 25 °C (levaduras).

El crecimiento máximo $Y_{\text{máx}}$ y la velocidad máxima de crecimiento (h^{-1}), se obtuvieron a través de la ecuación del modelo de Gompertz utilizando el software Statistica. ink versión 10.0, con la siguiente formula:

$$N(t) = N_0 + C \exp[-\exp(-B(t - M))]$$

Dónde:

- **N (t):** Es la cantidad de microorganismos que varía con el tiempo;
- **No:** Es la cantidad de microorganismos en un momento inicial;
- **C:** Es el nivel máximo o concentración de incremento de microorganismos;
- **B:** Es la velocidad máxima específica;
- **t:** En un tiempo dado de análisis;
- **M:** Es el tiempo en el que la velocidad máxima específica se presenta.

Los resultados indicaron que las bacterias alcanzaron la fase estacionaria entre 10 y 12 h y las levaduras entre 12 y 15 h, respectivamente. Este tiempo es de interés, ya que en algunos estudios se ha informado que las células en esta fase son más resistentes al estrés (Teixeira *et al.*, 1995; Corcoran *et al.*, 2004). La mayor tolerancia al estrés en esta fase de crecimiento se ha atribuido a una respuesta natural a la deficiencia de nutrientes y a la acumulación de metabolitos tóxicos (Páez, 2013), cualidad de interés, ya que durante la fermentación los microorganismos están sometidos a altas temperaturas (alrededor de 50 °C) y condiciones aerobias y anaerobias.

No se observaron diferencias estadísticamente significativas ($p \leq 0.05$) entre el crecimiento máximo $Y_{\text{máx}}$ de las bacterias lácticas *L. plantarum* 16 (1.9144 ± 0.031)^a y *L. fermentum* 14 (1.931 ± 0.011)^a, así como entre las bacterias ácido acéticas *A. tropicalis* 61 (1.474 ± 0.003)^c y *A. pasteurianus* 98 (1.471 ± 0.021)^c, sin embargo entre las tres cepas de levaduras se observaron diferencias significativas entre *S. cerevisiae* 120 (1.167 ± 0.476)^e, *S. cerevisiae* var, *diasticus* 23 (1.245 ± 0.034)^d y *S. cerevisiae* 58 (1.765 ± 0.550)^b, del mismo modo la velocidad específica de crecimiento, para cada microorganismo, presentó comportamientos diferentes, *S. cerevisiae* 120 ($0.522 \pm 0.317 \text{ h}^{-1}$)^A, *S. cerevisiae* var, *diasticus* 23 ($0.169 \pm 0.024 \text{ h}^{-1}$)^E, *S. cerevisiae* 58 ($0.142 \pm 0.01 \text{ h}^{-1}$)^F, *L. plantarum* 16 ($1.09 \pm 0.004 \text{ h}^{-1}$)^B, *L. fermentum* 14 ($0.89 \pm 0.016 \text{ h}^{-1}$)^{DC}, *A. tropicalis* 61 ($1.08 \pm 0.077 \text{ h}^{-1}$)^B y *A. pasteurianus* ($0.53 \pm 0.011 \text{ h}^{-1}$)^C.

5.2 Estandarización de los consorcios iniciadores

La cantidad de biomasa obtenida por cada una de las cepas fue de 2.5 ± 0.19 y 3.46 ± 0.21 g, cosechadas en cultivos de 50 mL en fase estacionaria, a partir de 1 g de biomasa se determinó la cantidad de UFC/g (Tabla 5.1).

Se establecieron consorcios de 10 g de biomasa suspendidos en 1 L de agua peptonada estéril. De acuerdo al papel fisiológico y el predominio de cada grupo de microorganismos durante la fermentación, cada consorcio incluía un 70 % levaduras (7 g), 15 % de BAL (1.5 g) y 15 % BAA (1.5 g). Previo a la inoculación del grano de cacao, se contaron las colonias de levaduras, BAL y BAA presentes en la suspensión bacteriana para verificar que la cantidad de células se mantuviera en un rango de 10^9 - 10^{10} UFC/mL (Tabla 5.2). Cantidad requerida para esta investigación, pues se hipotetizó que, al inocular el grano de cacao con una concentración elevada de microorganismos, ésta podría dominar la microbiota nativa.

TABLA 5.1 Concentración celular (UFC/g) de biomasa de levaduras, BAL y BAA.

Cepa	Concentración celular	
	UFC/g	Log UFC/g
<i>S. cerevisiae</i> 120	4.80×10^9	9.68 ± 0.13
<i>S. cerevisiae</i> var. <i>diasticus</i> 23	5.02×10^9	9.69 ± 0.11
<i>S. cerevisiae</i> 58	2.00×10^9	9.30 ± 0.08
<i>L. fermentum</i> 16	6.50×10^{10}	10.81 ± 0.13
<i>L. plantarum</i> 14	4.5×10^{10}	10.87 ± 0.23
<i>A. pasteurianus</i> 98	5.25×10^{10}	10.71 ± 0.09
<i>A. tropicalis</i> 61	5.57×10^{10}	10.74 ± 0.36

TABLA 5.2 Concentración celular (UFC/mL) de los consorcios utilizados para inocular el cacao.

Conformación de los consorcios iniciadores						UFC/mL	Log UFC/mL
C4	LV3	LAB1	LAB2	AAB1	AAB2	5.4 x 10 ¹⁰	10.73 ± 0.16
C5	LV1	LV2	LV3	LAB1	AAB1	1.00 x 10 ¹⁰	10.00 ± 0.22
C6	LV1	LV2	LAB1	AAB1		1.23 x 10 ¹⁰	10.09 ± 0.24
C7	LV1	LV3	LAB1	AAB1		1.43 x 10 ¹⁰	10.16 ± 0.13
C8	LV2	LV3	LAB1	AAB1		1.25 x 10 ¹⁰	10.07 ± 0.14

LV1: *S. cerevisiae* var. *diasticus* 23; LV2: *S. cerevisiae* 58; LV3: *S. cerevisiae* 120;
 LAB1: *L. plantarum* 14; LAB 2: *L. fermentum* 16;
 AAB1: *A. pasteurianus* 98 y AAB2 *A. tropicalis* 61

Con las siete cepas de microorganismos se realizaron combinaciones para obtener cinco consorcios experimentales. En noviembre de 2018, se realizó un primer ensayo con el consorcio (C4) y en abril 2019 se estudiaron los consorcios (C5, C6, C7 y C8). En ambos ensayos se consideró un testigo (T1 y T2) referido como la fermentación sin consorcio iniciador, es decir, la fermentación nativa.

5.3 Viabilidad de los grupos de microorganismos durante la fermentación de cacao

Los cambios relacionados con la sucesión de poblaciones microbianas durante las cinéticas de fermentación tienen un impacto significativo en el desarrollo de precursores de sabor y aroma que favorecen las características sensoriales de la cocoa, de la manteca y del chocolate (Ostovar & Keeney, 1973; Schwan, 1998; Camu *et al.*, 2008b; Lagunes Galvez *et al.*, 2007; Lefeber *et al.*, 2011; Naik & Kumar, 2014; Hamdouche *et al.*, 2015). El comportamiento de los tres grupos principales de microorganismos (levaduras, BAL y BAA) encontrados durante las fermentaciones de cacao con y sin consorcio iniciador (testigo) fue monitoreado cuantitativamente en todas las cajas de fermentación.

5.3.1 Evolución de las levaduras en las fermentaciones de cacao con y sin consorcio iniciador

En la Figura 5.2 se muestra el comportamiento de las levaduras en las fermentaciones de cacao con y sin consorcio iniciador. En los lotes de cacao fermentado con *S. cerevisiae* 120, *S. cerevisiae* var, *diasticus* 23 y *S. cerevisiae* 58, la cuenta viable de levaduras aumentó en las primeras horas de fermentación, alcanzando su máximo a las 12 h con una población de $10 \log_{10}$ UFC/mL, exhibiendo un crecimiento más pronunciado que la población de levaduras de las fermentaciones testigo.

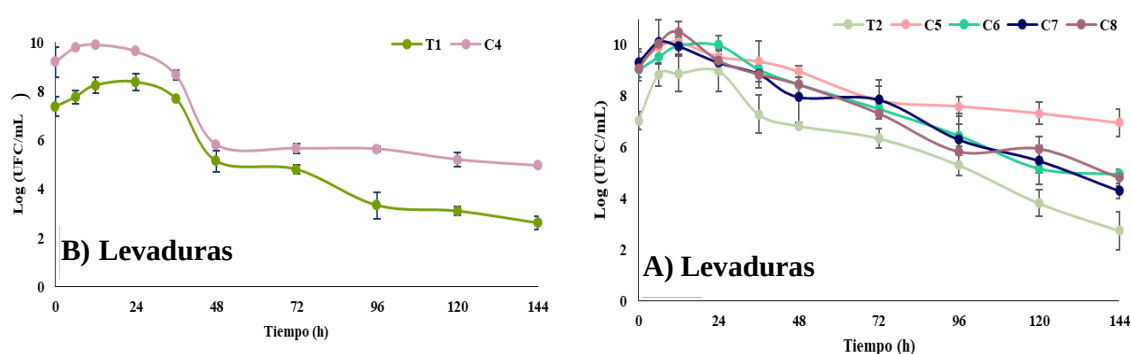


FIGURA 5.2 Evolución de las levaduras durante la fermentación de granos de cacao. A) Fermentación noviembre-2018 y B) Fermentación abril-2019. C4-C8: fermentaciones de cacao inoculado con los consorcios iniciadores. T1 y T2: Testigos, fermentaciones por microbiota nativa.

Esta diferencia podría estar relacionada con la elevada concentración de levaduras en el grano inoculado, las que posiblemente fueron capaces de consumir más rápido los carbohidratos (glucosa, fructosa, sacarosa y pentosa) de la pulpa mucilaginoso. La fermentación de cacao en cajas, pilas o montones con consorcios iniciadores puede contribuir a acelerar y efectuar más rápido el proceso de fermentación en comparación con una fermentación endógena, dado que los carbohidratos y el ácido cítrico son metabolizados por las levaduras en un lapso de aproximadamente 24 h (Leal *et al.*, 2008; Lefeber *et al.*, 2012; Ramos *et al.*, 2014; Batista *et al.*, 2015; Sandhya *et al.*, 2016). Debido a la oxigenación del

grano de cacao por el mezclado y a la reducción de la pulpa metabolizada por los microorganismos, el ambiente aeróbico generado provocó la disminución en las poblaciones de levaduras, sin embargo, a pesar de esta pérdida, hasta el final de la fermentación se obtuvieron recuentos celulares mayores de 5.0 Log₁₀ UFC/mL cuando se inoculó con los consorcios que contenían *S. cerevisiae*.

En estudios realizados por Batista *et al.* (2015); Koné *et al.*, (2016) y Magalhães da Veiga Moreira *et al.* (2017), en los que se han aplicado consorcios iniciadores experimentales en cacao, consideran que el éxito del consorcio radica principalmente en las levaduras, debido a la producción de numerosos metabolitos aromatizantes que impactan positivamente la calidad sensorial. Además, Hansen *et al.* (1998), Ho *et al.* (2015), Meersman *et al.* (2016) y Sandhya *et al.* (2016) mencionaron que *S. cerevisiae* suele dominar durante el proceso de fermentación debido a su capacidad para soportar las condiciones adversas que se establecen durante la fermentación, que incluye altos niveles de etanol, ácidos orgánicos, pH ácido, baja disponibilidad de oxígeno y alta temperatura, además de mostrar rápido crecimiento y competitividad por el sustrato con las especies de BAL.

5.3.2 Evolución de BAL en las fermentaciones con y sin consorcio iniciador

No se observó ningún crecimiento en las poblaciones de BAL entre las 0-12 h a pesar de la inoculación de *L. plantarum* y *L. fermentum* (Figura 5.3), precisamente cuando las levaduras que incluían *S. cerevisiae* 120 estaban en su punto máximo (10.0 Log₁₀ UFC/mL), sin embargo, después las 12 h, las poblaciones se mantuvieron arriba de 7.0 Log₁₀ UFC/mL, al menos hasta las 72 h, lo que permitió producir algunos metabolitos (ácido láctico, etanol, ácido acético, glicerol, manitol, CO₂, diacetilo, acetoína y acetaldehído) que impactan sensorialmente en los granos de cacao.

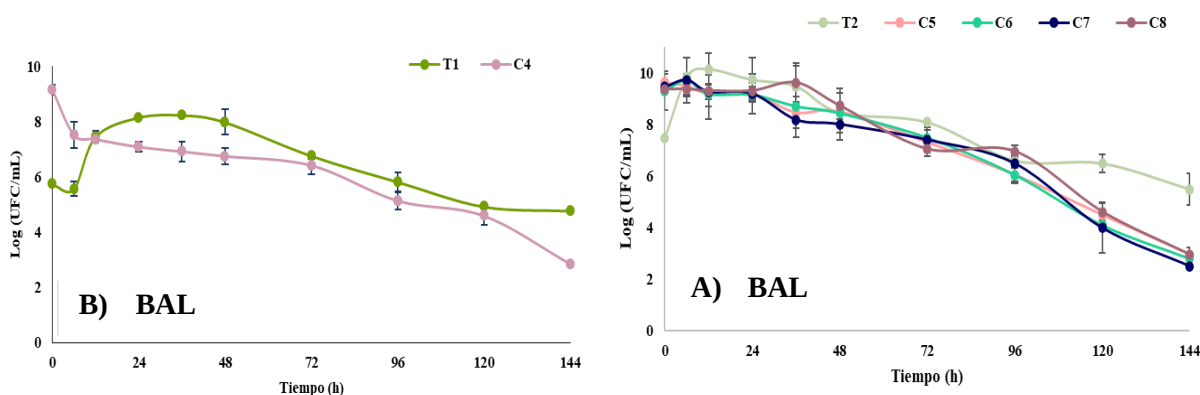


FIGURA 5.3 Evolución de la BAL durante la fermentación de granos de cacao. A) Fermentación noviembre-2018 y B) Fermentación abril-2019. C4-C8: fermentaciones de cacao inoculado con los consorcios iniciadores. T1 y T2: Testigos, fermentación por microbiota nativa.

Sin embargo, altas poblaciones de BAL ($> 10^8$ UFC/mL) conducen a una producción excesiva, principalmente de ácido láctico, su migración a los granos y su no volatilidad puede contribuir a la alta acidez y a una calidad de cocoa y chocolate ligeramente inferior (Ho *et al.*, 2015) este aumento significativo por encima de 8.0 Log₁₀ UFC/mL se observó en la fermentación testigo de ambas cosechas entre las 6 y 48 h, también ha sido reportado a menudo en fermentaciones nativas y en fermentaciones de laboratorio utilizando medios de pulpa de cacao con aislados de cultivos puros de BAL (Lefeber *et al.*, 2011; Lima *et al.*, 2011; Ho *et al.*, 2015).

5.3.3 Evolución de BAA en las fermentaciones con y sin consorcio iniciador

En cuanto al comportamiento de BAA (Figura 5.4) se observó que, a pesar de haber sido inoculadas a concentraciones elevadas, exhibieron un declive de 2.0 ciclos Log en las primeras 12 h. Esta disminución pudo estar asociada al ambiente anaerobio que no favoreció su crecimiento (Schwan y Wheals, 2004; Sandhya *et al.*, 2016; de Vuyst y Weckx, 2016; De Roos y De Vuyst, 2018).

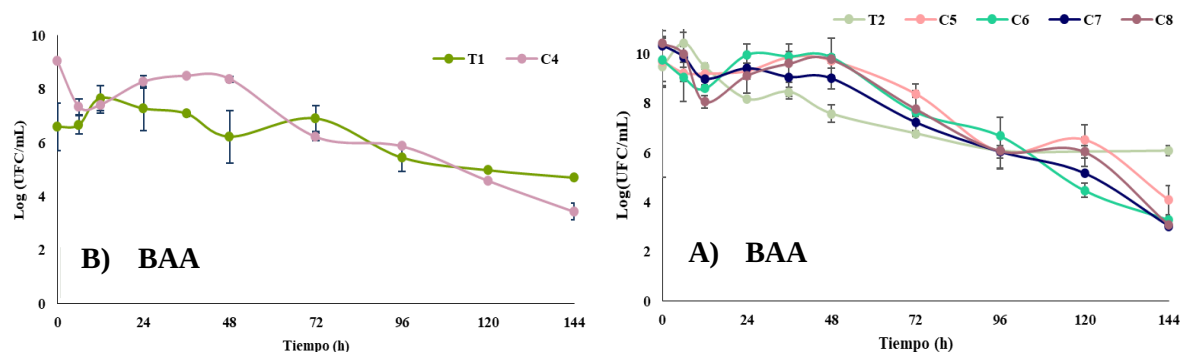


FIGURA 5.4 Evolución de BAA durante la fermentación de granos de cacao. A) Fermentación noviembre-2018 y B) Fermentación abril-2019. C4-C8: fermentaciones de cacao inoculado con los consorcios iniciadores. T1 y T2: Testigos, fermentaciones por microbiota nativa.

La población de BAA aumentó a partir de las 12-48 h, comportamiento que se atribuye a que la masa fermentativa se volvió más aireada debido a la lixiviación de la pulpa, creando un ambiente aerobio, lo que les permitió realizar actividades metabólicas clave en la formación de precursores de sabor y aroma, tales como la acidificación de los granos de cacao y el aumento de temperatura en la masa de fermentación (Schwan & Wheals, 2004; Saltini *et al.*, 2013).

5.4 Evolución de la temperatura durante las fermentaciones de cacao con y sin consorcio iniciador

La evolución de la temperatura en las fermentaciones con granos de cacao inoculados con los consorcios (C4-C8) y en las fermentaciones nativas de cacao (T1 y T2), se muestra en la Figura 5.5. Se registró la temperatura ambiente para comparar la influencia del proceso fermentativo sobre la generación de calor.

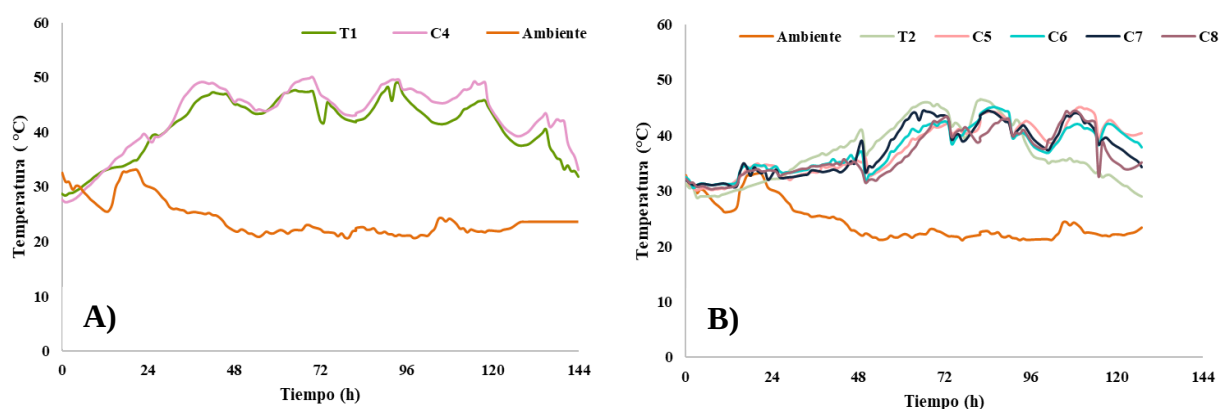


FIGURA 5.5 Evolución de la temperatura durante la fermentación de granos de cacao. A) Fermentación noviembre-2018 y B) Fermentación abril-2019. C4-C8: fermentaciones de cacao inoculado con los consorcios iniciadores. T1 y T2: Testigos, fermentaciones por microbiota nativa.

La temperatura ambiente se mantuvo entre 27 y 32 °C. En el caso de las fermentaciones de la cosecha de abril 2019, la temperatura máxima fue de 43 °C mientras que la temperatura registrada en noviembre se mantuvo por arriba de 50 °C aumentando linealmente durante las primeras 48 h, alcanzando un máximo a las 72 h y un descenso hacia el final de la fermentación.

El comportamiento fue similar en el cacao con y sin consorcio iniciador. Algunos autores (Sandhya *et al.*, 2016; Schwan, 1998) han asumido que entre 40 °C y 42 °C, se obtiene buen porcentaje de granos bien fermentados y en el presente estudio esta temperatura se alcanzó poco antes de las 48 h y se mantuvo hasta el final de la fermentación. El aumento de la temperatura durante la fermentación de cacao coincidió con el crecimiento de las BAA en ambas cajas de fermentación (con y sin consorcio iniciador), que se vio favorecido por el mezclado, como resultado de la estimulación de las reacciones exotérmicas de la microbiota aerobia (Passos *et al.*, 1984). Los descensos de temperatura se relacionaron con el tiempo en que se retiraron los termopares de las cajas para realizar el mezclado.

5.5 Evolución del pH en la pulpa y cotiledón de cacao durante las fermentaciones con y sin consorcio iniciador

La evolución del pH de la pulpa mucilaginosa y del cotiledón del grano de cacao durante la fermentación con y sin consorcio iniciador se presentan en la Figura 5.6.

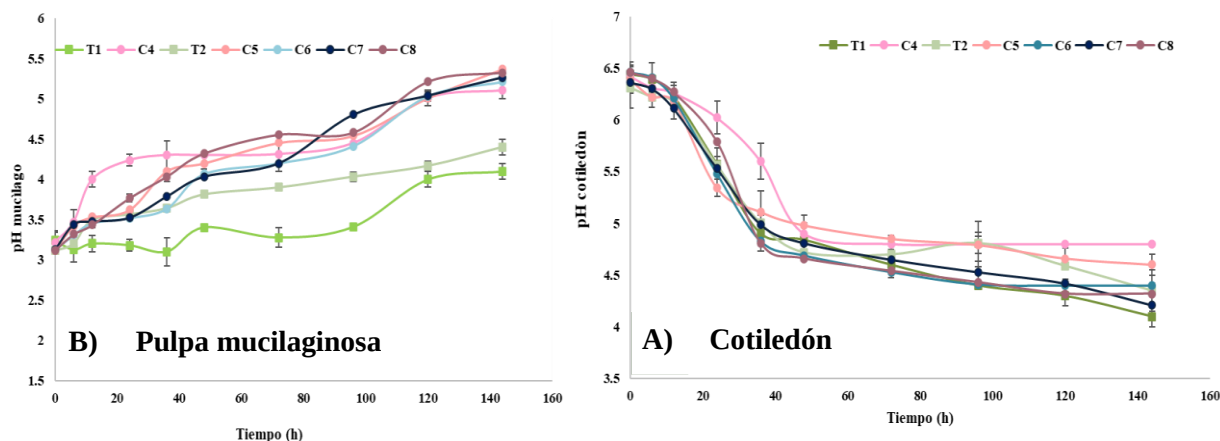


FIGURA 5.6 Evolución del pH A) del mucílago y B) del cotiledón; durante la fermentación de granos de cacao con y sin consorcio iniciador. C4-C8: fermentaciones de cacao inoculado con los consorcios iniciadores. T1 y T2: Testigos, fermentaciones por microbiota nativa.

El pH inicial de la pulpa fue de 3.3. Este valor es atribuido a la presencia de ácido cítrico (Ozturk & Young, 2017). En todas las fermentaciones con y sin consorcio iniciador el pH en la pulpa se incrementó conforme avanzó el tiempo de fermentación; de acuerdo a estudios realizados por Camu *et al.* (2008a); Lefeber *et al.* (2011); Ho *et al.* (2014), el pH tiende a aumentar debido a la capacidad de algunas levaduras de degradar ácido cítrico, que también se elimina a través de los lixiviados que drenan de las cajas fermentadoras (Camu *et al.*, 2008a; Lefeber *et al.*, 2011; Ho *et al.*, 2014), además de la producción de alcoholes superiores y etanol, producidos por el metabolismo de las levaduras que posteriormente migran al interior de los cotiledones (Schwan & Wheals, 2004).

El pH del cotiledón en granos con y sin consorcio iniciador fue significativamente mayor que en la pulpa, y pasó de 6.5 a 4.4- 4.7 durante la fermentación; hasta el momento, se sabe que la disminución de pH se produce por la difusión de los ácidos (ácidos acético, láctico, oxálico, málico, succínico y fosfórico) que provocan la muerte del embrión y la liberación de enzimas y sustratos que desencadenan una serie de reacciones bioquímicas causadas por la actividad microbiana. De acuerdo a lo referenciado por Passos *et al.* (1984); Lagunes Gálvez *et al.* (2007); Afoakwa *et al.* (2008) y Rodríguez-Campos *et al.* (2011), si los granos de cacao presentan un pH final en el cotiledón de entre 5.5 y 5.8 después de la fermentación se consideran mal fermentados, mientras que los granos con un pH entre 4.6 y 5.1 se consideran bien fermentados, el pH final en los granos de cacao inoculado y no inoculado fue de 4.4- 4.7, por lo tanto se mantuvo dentro del rango reportado para granos bien fermentados.

5.6 Prueba de corte de los granos de cacao fermentados y secos

La prueba de corte permitió clasificar el grano de cada uno de los tratamientos en función de la coloración interna de los cotiledones (Figura 5.7).

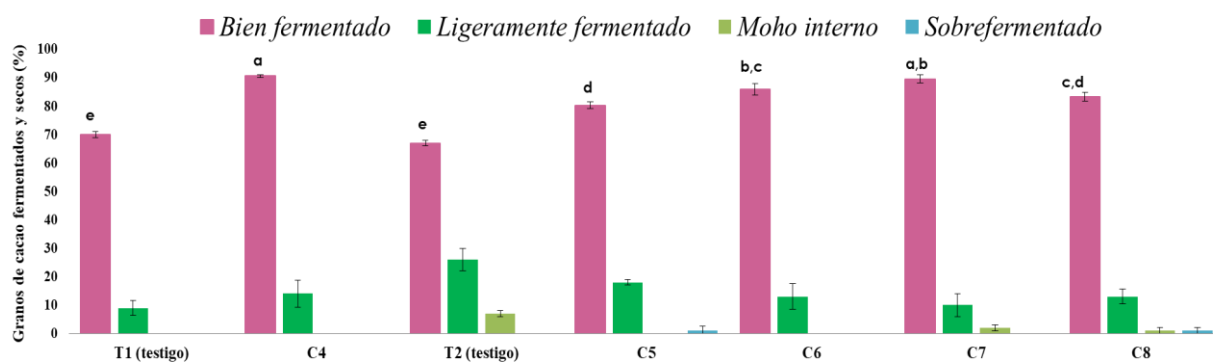


FIGURA 5.7 Porcentaje de granos secos por lote de cacao, según la clasificación de la prueba de corte. C4-C8: fermentaciones de cacao inoculado con los consorcios iniciadores. T1 y T2: Testigos, fermentaciones espontáneas.

Los resultados de la prueba de corte mostraron una diferencia entre la cantidad de granos bien fermentados de las fermentaciones sin consorcio iniciador T1 (75 %) y T2 (67 %), con respecto al grano fermentado con los consorcios iniciadores C4 (91 %), C5 (81 %), C6 (86 %), C7 (91 %) y C8 (85 %), lo que indica un mayor grado de fermentación que los testigos. Estas diferencias significativas se atribuyen principalmente a las actividades metabólicas de los microorganismos formadores del consorcio iniciador durante el proceso fermentativo, dado que las condiciones de secado en las que se manejaron todas las muestras fueron las mismas. No se detectaron granos pizarrosos, sobrefermentados o con algún daño por hongos o insectos en ninguna de las muestras inoculadas, mientras que en la muestra testigo (T2) se detectó 7 % de granos con moho; este defecto se relaciona con la temperatura registrada a partir de las 72 h de fermentación, la cual descendió hasta alcanzar un valor cercano a 25 °C propiciando la aparición de hongo en el grano.

En función de los estándares generales nacionales e internacionales, el cacao debe cumplir con requisitos mínimos de calidad para su comercialización, que dependerán de cada fabricante (Dubon & Sánchez, 2016; Romanens *et al.*, 2020). En México debe de cumplir con las especificaciones de la prueba de corte de la NOM-F-272; requisitos que se muestran en la Tabla 5.3-A. Y en granos de cacao de alta calidad debe cumplir con las especificaciones de la Tabla 5.3.

Los resultados de este trabajo indicaron que todas las fermentaciones realizadas con consorcios iniciadores se presentaron valores de prueba de corte aceptables por encima del mínimo (75 %) requerido y los defectos se mantuvieron por debajo de los porcentajes establecidos para cacao clase y de alta calidad.

TABLA 5.3 A) Límites de defectos, después de la prueba de corte de acuerdo a la NOM-F-272; B) Grado de fermentación requerido para la comercialización de granos de cacao de alta calidad

A)	Defectos	Cacao fermentado clase México I
	Pizarrosos	4 % máx.
	Violáceos	10 % máx.
	Grano con hongos	4 % máx.
	Grano dañado o infestado por insectos	4 % máx.
	Pacha	2 % máx.
	Grano roto	2 % máx.
	La suma de grano con hongos y de grano dañado por insectos	6 % máx.
B)	Granos bien fermentados	75 % min.
	Granos insuficientemente fermentados	20 % máx.
	Moho interno	3 % máx.
	Pizarrosos	1 % máx.
	Sobrefermentados	3 % máx.
	Daño por insectos	3 % máx.

(Dubon & Sánchez, 2016)

5.7 Análisis sensorial del licor de cacao

Los panelistas evaluaron siete licores de cacao, cinco producidos con el cacao inoculado con los diferentes consorcios iniciadores y 2 testigos correspondientes a la fermentación endógena. El análisis sensorial recibió calificaciones diferentes para varios atributos sensoriales positivos y negativos (apartado 4.1.6).

En la Figura 5.8, se muestra los resultados obtenidos para la evaluación sensorial del cacao procesado en la cosecha noviembre-2018. Con el consorcio C4, conformado por las cepas autóctonas *S. cerevisiae* 120, *L. plantarum* 14, *L. fermentum* 16, *A. tropicalis* 61 y *A. pasteurianus* 98, se detectaron atributos sensoriales deseables de los cuales, cacao, nuez y frutos rojos fueron calificados como los más intensos, seguido de uva pasa y melaza, además

de ligeras notas a vainilla y miel; por otro lado, el amargor, astringencia y la acidez acética estuvieron presentes, pero fueron poco notables.

El testigo (T1) mostró atributos positivos poco perceptibles, por debajo de una puntuación de 2 para los descriptores nuez y cacao, mientras que predominaron los defectos como el acético, el verde, el láctico, la astringencia y el amargor.

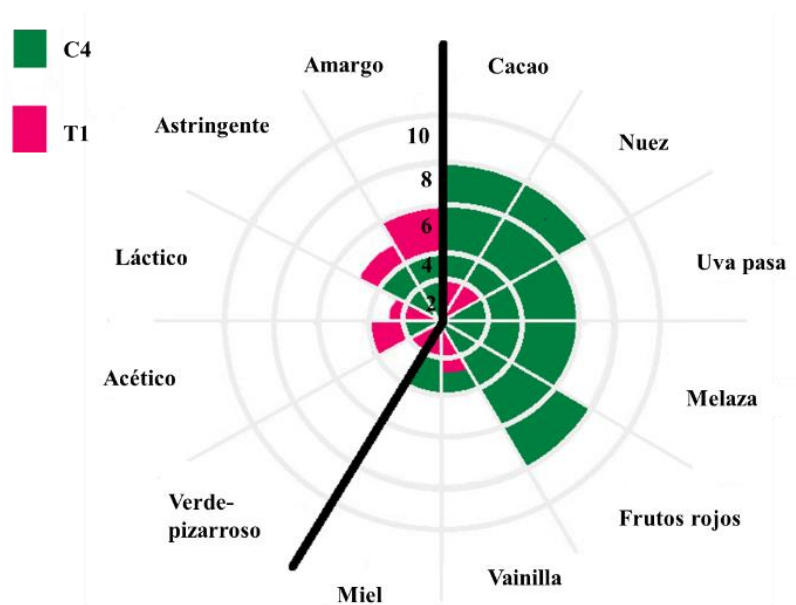


FIGURA 5.8 Perfiles de sabor del licor de cacao producido a partir de granos de cacao fermentados con y sin consorcio iniciador; cosecha noviembre-2018. C4) *S. cerevisiae* 120, *L. plantarum* 14, *L. fermentum* 16, *A. tropicalis* 61 y *A. pasteurianus* 98 y T1) Testigo. El centro del diagrama corresponde a la intensidad de sabor más baja y el perímetro a la intensidad de sabor más alta.

Los licores de cacao obtenidos con los granos de cacao fermentados con los consorcios iniciadores (C5, C6, C7 y C8) junto con su testigo (T2) de la cosecha de abril-2019, se muestran en la Figura 5.9. El análisis sensorial determinó diferencias entre todos los licores obtenidos, destacando mayores notas positivas cuando se aplicaron los consorcios iniciadores con respecto al testigo (T2). Los panelistas detectaron en las muestras provenientes de cacao fermentado con los consorcios, además de notas dulces y florales como las percibidas con el consorcio C4, la nota picante y esta nota específica puede atribuirse a *S.*

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

cerevisiae var. *diasticus* 23 y *S. cerevisiae* 58, que se caracterizan por la producción de ésteres que imparten este sabor.

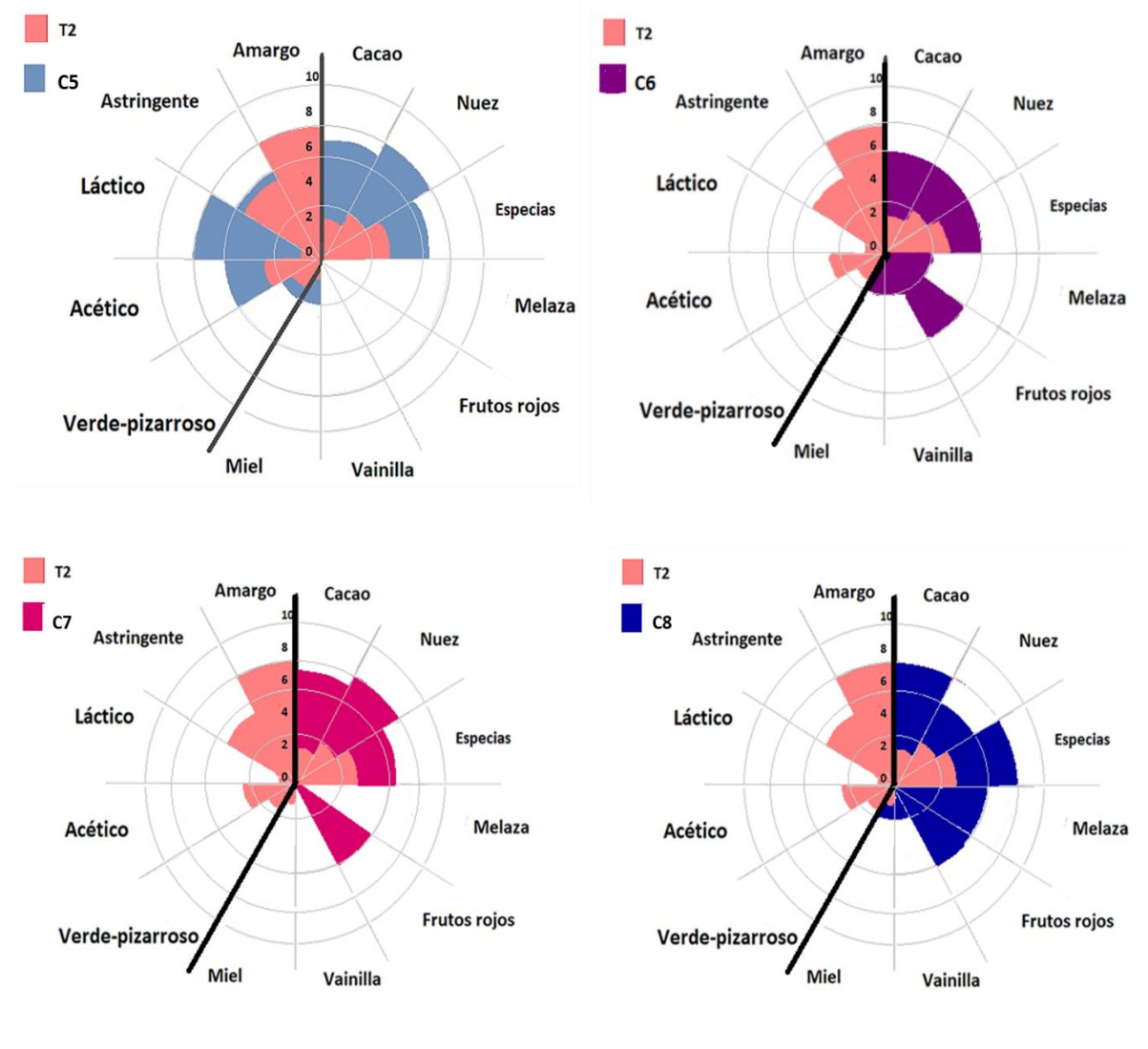


FIGURA 5.9 Perfiles de sabor del licor de cacao producido a partir de granos de cacao fermentados con y sin consorcio iniciador; cosecha abril-2019. C5) *S. cerevisiae* var. *diasticus* 23; *S. cerevisiae* 58; *S. cerevisiae* 120; *L. plantarum*; *A. pasterianum* (C6) *S. cerevisiae* var. *diasticus* 23; *S. cerevisiae* 58; *L. plantarum*; *A. pasterianum* (C7) *S. cerevisiae* var. *diasticus* 23; *S. cerevisiae* 120; *L. plantarum*; *A. pasterianum* (C8) *S. cerevisiae* var. *diasticus* 23; *L. plantarum*; *A. pasterianum*; T2) Testigo. El centro del diagrama corresponde a la intensidad de sabor más baja y el perímetro a la intensidad de sabor más alta.

En general, los panelistas mostraron mayor aceptabilidad por los licores producidos con el cacao inoculado, lo cual indica que es posible modular el sabor del licor de cacao. Estos resultados indican que el análisis sensorial puede estar fuertemente relacionado con el análisis metabolómico, dado que los compuestos químicos que influyen en estos atributos son tanto volátiles como no volátiles y que los consorcios iniciadores aparentan tener un impacto positivo en la modulación de sabor aún en las etapas postfermentativas.

5.8 Análisis del perfil de compuestos volátiles

Con la información obtenida por MS se identificaron 39 metabolitos durante la fermentación modulada (C4) y 24, 27 y 22 al final del secado, tostado y conchado, respectivamente; mientras que en el testigo (T2) se identificaron 37, 15, 16 y 13 metabolitos, respectivamente, al final de cada una de las etapas anteriormente indicadas. Los metabolitos se agruparon en ácidos carboxílicos, alcoholes, aldehídos, cetonas, ésteres, pirazinas, AG y compuestos pertenecientes a otras clases. La Tabla 5.4 muestra los compuestos identificados en la presente investigación y el aroma descriptivo reportado en estudios previos.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

TABLA 5.4 Compuestos volátiles identificados en granos de cacao fermentados sin consorcio iniciador (T1), y con consorcio iniciador (C4) durante la fermentación (F) y postfermentación: D) Secado, (R) Tostado, (C) Conchado y (ND) No detectado.

Grupo químico	Nombre del compuesto	Formula	Tiempo de retención (min)	Masa	Olor y sabor	Ventana de deconvolución	Factor de coincidencia	Índice de retención	Muestra	
									C4	T1
Ácidos	Ácido 2-metilbutanoico	C ₅ H ₁₀ O ₂	5.85	102.0680	Queso añejo sudoroso	25	85.7	811	F	F
	Ácido 2-propenoico	C ₅ H ₆ O ₂	2.29	72.0211	-	25	88.6	981	F, S	F, S, T, C
	Ácido acético	C ₂ H ₄ O ₂	2.21	60.0211	Agrio, vinagre	25	83.9	576	F, T	F, S, T, C
	Ácido láctico	C ₃ H ₆ O ₃	1.52	90.0316	Agrio	50	92.7	838	F, S, T	F, S, T, C
	Ácido propanodioico	C ₃ H ₄ O ₄	2.44	104.0109	Picante, desagradable	100	84.2	818.5	F	F, S, T
	Ácido propanoico	C ₃ H ₆ O ₂	3.17	74.0367	Picante, rancio	25	86.9	676	F	F, S, T
	Anhídrido propanoico	C ₆ H ₁₀ O ₃	2.16	130.0629	-	25	90.9	921	F	F
	Ácido propiónico	C ₃ H ₆ O ₂	2.07	74.0367	-	25	82	875	F	F
Alcoholes	1,3-Butanodiol	C ₄ H ₁₀ O ₂	5.76	90.0680	Dulce, florido, caramelo	100	83.1	824	F	F
	1-Octen-3-ol	C ₈ H ₁₆ O	2.85	128.1201	Frutal	50	76.4	969	F	F
	2,3-Butanodiol	C ₄ H ₁₀ O ₂	5.40	90.0680	Dulce, florido	200	92.5	743	F, S, T, C	F
	2,3-Butanodiol (Isom)	C ₄ H ₁₀ O ₂	5.77	90.0680	-	100	90.8	-	F	F
	2-Etilhexanal	C ₈ H ₁₆ O	1.95	128.1201	Frutal	100	91.3	414.3	F, S, T, C	F, S
	2-Heptanol	C ₇ H ₁₆ O	3.84	116.1201	Dulce, cítrico	25	80.2	879	F	F
	2-Hexanol	C ₆ H ₁₄ O	6.09	102.1044	Afrutado, verde	100	82.2	780	F, S, T, C	F, S, T

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

	3-Hexanol	C ₆ H ₁₄ O	5.90	102.1044	Afrutado, verde	150	89	780	F, S, T, C	F, S, T
	3-Metil-3-pentanol	C ₆ H ₁₄ O	3.74	102.1044	Florido, dulce	25	92.4	709	F, S, T, C	F
Aldehídos y cetonas	2,3-Pentanediona	C ₅ H ₈ O ₂	2.9	100.0524	Mantecoso, nuez	25	90.4	790	F	F
	2-Metilbutanal	C ₅ H ₁₀ O	2.47	86.0731	Malta, chocolate	100	90.1	643	F, S, T, C	F, S
	2-Octen-4-One	C ₈ H ₁₄ O	2.79	126.1044	Afrutado, floral	25	76.2	960	F, S, T, C	ND
	3-Metilbutanal	C ₅ H ₁₀ O	2.73	86.0731	Malta, chocolate	100	90.2	643	F	F
	Acetaldehído	C ₂ H ₄ O	2.28	44.0262	Hojas verdes afrutadas	100	81.3	408	F	ND
	Acetoína	C ₄ H ₈ O ₂	3.56	88.0524	Mantequilla, nata	25	92.1	717	F, S, T, C	F
	Acetona	C ₃ H ₆ O	1.68	58.0418	-	25	90.6	455	F	F
	Acetil valerilo	C ₇ H ₁₂ O ₂	2.31	128.0837	-	100	92.2	989	F	ND
	Benzaldehído	C ₇ H ₆ O	9.25	106.0418	Almendra, cereza	25	95.7	782	F	F
	Bencenoacetaldehído	C ₈ H ₈ O	15.97	120.0575	Verde	100	81.3	-	F, S, T	F
	Piperonal	C ₈ H ₆ O ₃	17.13	150.0316	-	100	88.9	-	T, C	ND
	Propanal	C ₃ H ₆ O	2.22	58.0418	Afrutado	25	88.5	508	F	F
Ésteres	Acetato de etilo	C ₄ H ₈ O ₂	4.1	88.0524	Piña	100	96.7	-	F	ND
	Acetato2- metoxietanol	C ₅ H ₁₀ O ₃	3.91	118.0629	-	100	88.5	-	ND	F
Ácidos grasos de cadena larga	Ácido mirístico	C ₁₄ H ₂₈ O ₂	21.31	228.2089	-	150	78.2	-	F, S, T, C	F, S, T, C
	Ácido linoleico	C ₁₈ H ₃₂ O ₂	18.80	280.2402	-	150	89.1	-	F, S, T, C	F, S, T, C
	Ácido oleico	C ₁₈ H ₃₄ O ₂	18.88	296.2715	-	100	98.7	-	F, S, T, C	F, S, T, C
	Ácido araquidónico	C ₂₀ H ₃₂ O ₂	21.66	326.3184	-	200	83.1	-	F, S, T, C	F, S, T, C
	Ácido esteárico	C ₁₈ H ₃₆ O ₂	19.21	298.2871	-	200	98.3	-	F, S, T, C	F, S, T, C

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

	Ácido palmítico	C ₁₆ H ₃₂ O ₂	16.51	270.2558	-	200	98.5	-	F, S, T, C	F, S, T, C
Pirazinas	Trimetilpirazina	C ₇ H ₁₀ N ₂	10.67	122.0843	-	25	83.1	-	T, C	ND
	Tetrametilpirazina	C ₈ H ₁₂ N ₂	16.48	136.10004	Tostado, café, cacao	50	85.3	1008	T, C	T, C
	2,5-dimetilpirazina	C ₆ N ₈ N ₂	16.08	108.0687	Cacao, tostado	25	83.9	-	T, C	ND
	2,6-dimetilpirazina	C ₈ H ₁₂ N ₂	16.41	108.0687	-	25	81.3	-	T, C	ND
	3,5-dietil-2-metil pirazina	C ₉ H ₁₄ N ₂	18.02	150.1156	-	25	87.3	-	T, C	T, C
Otros	Benceno	C ₆ H ₆	1.91	78.0469	Aromático	100	87.1	680	S, T	ND
	Benzotiazol	C ₇ H ₅ NS	17.6	135.0142	Condimento	25	80.6	1208	F	F
	Isocianatoacetato de butilo	C ₇ H ₁₁ NO ₃	2.16	157.0738	-	25	82	-	S, T	ND
	Lactato de butilo	C ₇ H ₁₄ O ₃	5.42	146.0942	-	100	91	997	F	F
	Propiolactona	C ₃ H ₄ O ₂	1.41	72.0211	-	25	85.9	705	F	F
	Lactato de butilo	C ₆ H ₁₀ O ₃	6.1	130.0629	Caramelo	100	88.1	899	F	F

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.8.1 Influencia del consorcio iniciador sobre los compuestos volátiles y los ácidos grasos durante la fermentación del grano de cacao

El efecto del consorcio iniciador sobre la producción de compuestos volátiles y ácidos grasos durante la fermentación del grano de cacao se estudió mediante análisis de componentes principales (PCA). Para este análisis solo se consideró el consorcio C4 junto con su testigo (T1) de la cosecha noviembre-2019. Los datos experimentales obtenidos por HS-QTOF MS y GC-MS fueron normalizados, transformados (transformación z) y escalados, la matriz resultante fue de 51 x 30 (51 metabolitos identificados en las 30 muestras) por tratamiento de fermentación. la Figura 5.10 muestra el diagrama de dispersión (A: scores; B: loadings) de ambas fermentaciones durante los tiempos 0, 6, 12, 24, 36, 48, 72, 96, 120 y 144 h.

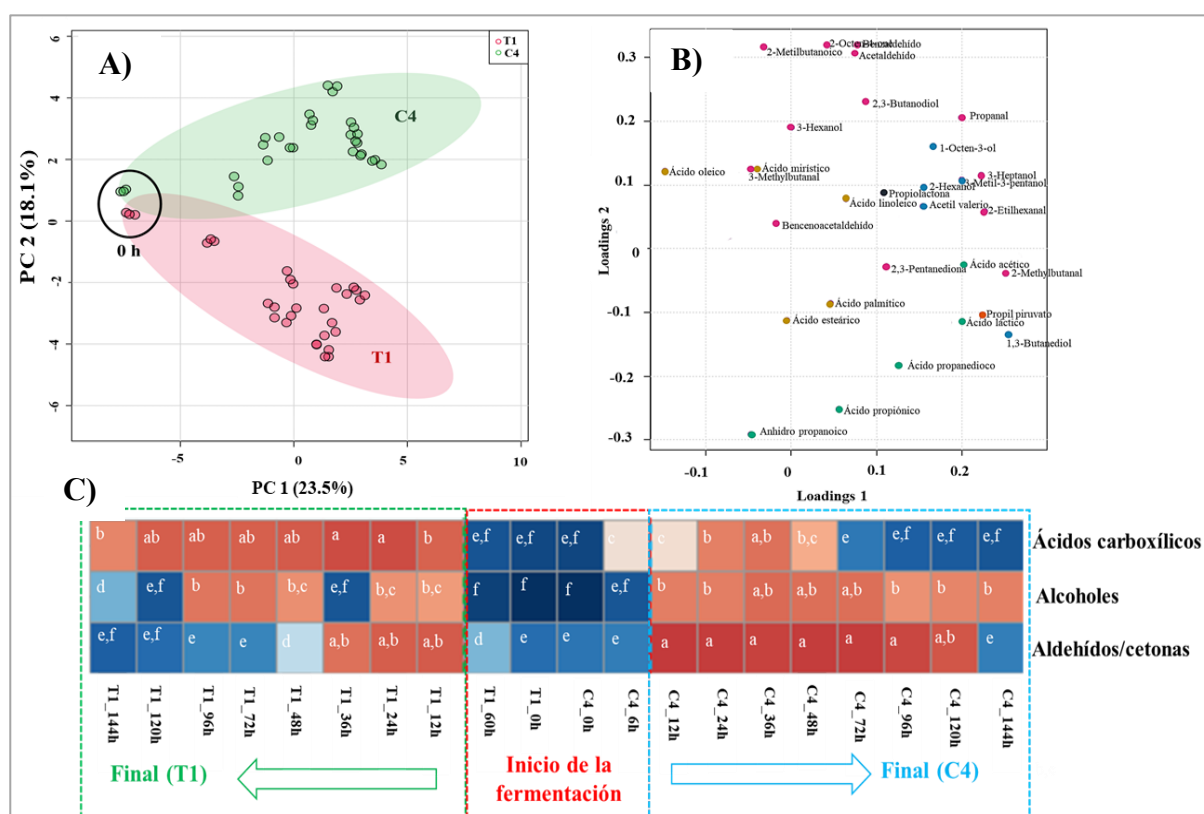


FIGURA 5.10 Análisis de componentes principales: (A) scores y (B) loadings de los componentes principales 1 (PC1) y 2 (PC2) de los compuestos volátiles de muestras de cacao fermentados con (C4) y sin (T1) consorcio iniciador; y (C) cambios en la concentración relativa de ácidos, alcoholes y aldehídos

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

durante la fermentación. La concentración relativa corresponde a la normalización por MSTUS, áreas de pico transformadas y escaladas.

El resultado reveló que los valores de los componentes principales 1 (PC1=23.5 %) y 2 (PC2=18.1 %) fueron suficientes para describir el 41.6 % de la variabilidad total y evidenció que las muestras inoculadas y las del testigo sometidas a fermentación experimentaron diferentes cambios metabólicos, que fueron particularmente relevantes después de 6 h. La aplicación del mapa de calor de análisis de clústeres reveló que las tres principales familias de compuestos identificados durante la fermentación (ácidos carboxílicos, alcoholes y aldehídos y cetonas) mostraron diferencias a medida que la fermentación progresó. En términos generales, la discriminación entre las muestras testigo y las inoculadas resultó a causa que estas últimas mostraron un contenido notable tanto de alcoholes como de aldehídos/cetonas. Por otra parte, la concentración de aldehídos/cetonas disminuyó en las muestras testigo durante la fermentación, mientras que se observó un mayor contenido de ácidos carboxílicos. Todas estas familias son producidas por la glicólisis anaeróbica y aeróbica durante la fermentación y ha sido demostrado que tienen impacto sensorial, positivo o negativo, en la calidad del chocolate (Bonvehi, 2005; Rodríguez-Campos *et al.*, 2012; Aprotosoaie *et al.*, 2016). Los cambios en la concentración relativa de los principales compuestos de ácidos carboxílicos, alcoholes y aldehídos se muestran en la Figura 5.11.

En este estudio se observó que los ácidos láctico y acético representaron entre el 21 % y el 90 % (dependiendo del tiempo de fermentación) de la concentración relativa total de los compuestos identificados (Figura 5.11-A). En las muestras inoculadas, el contenido máximo de ácido láctico fue del 4.7 % a las 48 h y el contenido de ácido acético alcanzó un máximo del 63 % a las 36 h. Este aumento puede estar relacionado con el recuento microbiano de BAA que durante ese tiempo alcanzó su máximo (8.0 Log₁₀ UFC/g). Meersman *et al.* (2016) y Schwan & Wheals (2004) consideran favorable que la mayor producción de ácido acético ocurra en la fermentación intermedia porque contribuye a la hidrólisis de compuestos y a la activación de enzimas endógenas del cotiledón, lo que permite

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

la producción de precursores del sabor, como azúcares reductores, aminoácidos y péptidos. Después de las 96 y 144 h, el contenido de ácidos carboxílicos fue inferior a 1 %. El contenido de ácido láctico en los testigos aumentó gradualmente desde el inicio de la de la fermentación hasta alcanzar 51 % a las 96 h y disminuyendo hasta 41 % al final de la fermentación. En cuanto al ácido acético, su contenido osciló entre 9 % y 25 %, este último valor medido al final de la de la fermentación. El exceso de ácidos tales, como el láctico, afecta a la calidad sensorial del producto final; estos compuestos se han asociado a notas desagradables, como rancio, ácido, queso y picante (Rodríguez-Campos *et al.*, 2012; Meersman *et al.*, 2016; Assi-Clair *et al.*, 2019).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

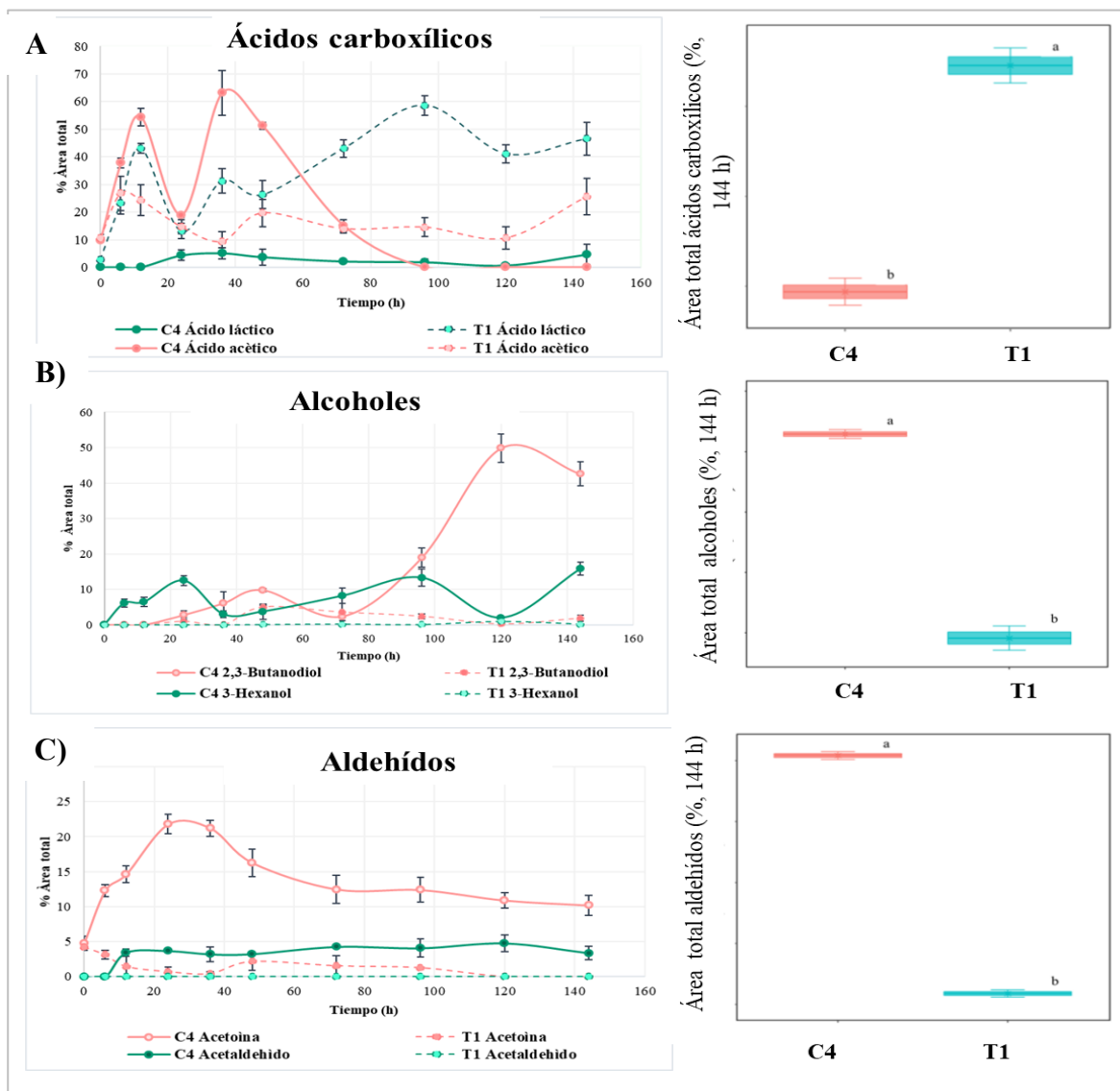


FIGURA 5.11 Evolución de los ácidos carboxílicos (A), alcoholes (B) y aldehídos (C) durante la fermentación de los granos de cacao con (C4) y sin (T1) consorcio iniciador.

La concentración de alcoholes difirió significativamente entre muestras con y sin consorcio iniciador. Un total de ocho alcoholes, 1,3-butanodiol, 1-octen.3-ol, 2,3-butanodiol, 2-etilhexanal, 2-heptanol, 2-hexanol, 3-hexanol, 3-metil-3-pentanol, se detectaron a lo largo del proceso de fermentación y se ha informado que todos ellos exhiben atributos deseables (Rodríguez-Campos *et al.*, 2012; Koné *et al.*, 2016). La máxima concentración de compuestos alcohólicos se detectó en la fermentación con consorcio iniciador (C4) a partir

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

de las 6 h, el 1,3-butanodiol y el 2,3-butanodiol fueron los alcoholes que mostraron una concentración superior al 40 % en las muestras provenientes de cacao inoculado mientras que el contenido final de este alcohol en los testigos fue del 2 % (Figura 5.11-B). Estas diferencias podrían estar estrechamente relacionadas con la mayor población de *S. cerevisiae* 120 en las muestras de cacao inoculado. Algunos informes sobre procesos de fermentación asistidos por microorganismos (Leal *et al.*, 2008; Lefeber *et al.*, 2012; Batista *et al.*, 2015; Sandhya *et al.*, 2016), reportan el impacto generado por algunas cepas, específicamente de levadura, que tienen la capacidad de acelerar el proceso de fermentación al consumir los azúcares contenidos en la pulpa, produciendo una variedad de compuestos aromáticos, incluyendo alcoholes.

En cuanto los aldehídos, se identificaron un total de 11, cuya concentración máxima se produjo con el consorcio iniciador C4, de los cuales, aldehídos como el acetaldehído y la acetoína aumentaron progresivamente a partir de las 12 h conforme avanzó la fermentación, manteniéndose hasta las 144 h de fermentación (Figura 5.11-C). Así, la concentración de acetoína aumentó de 4 % a 21 % durante las primeras 24 h, y disminuyó gradualmente hasta 10 % al final de la fermentación. Por el contrario, el contenido de acetoína en las muestras de testigo disminuyó gradualmente durante la fermentación hasta las 144 h; después de este tiempo este compuesto no fue detectado. El acetaldehído sólo se detectó en las muestras tratadas con el inóculo, aumentando de 0 % a 3.5 % entre las 6 y las 12 h, y permaneció constante hasta el final de la fermentación. Se ha demostrado que la formación de algunos aldehídos, como el acetaldehído y la acetoína, depende de las condiciones de fermentación y de la microbiota implicada. La acetoína se sintetiza de forma natural durante la fermentación alcohólica por descarboxilación del ácido pirúvico y se ha asociado al sabor del yogur y de la mantequilla cremosa (Xiao & Lu, 2014), mientras que el acetaldehído es producido por diversos microorganismos (Tanaka *et al.*, 1994). Así, la formación de estos dos compuestos podría estar estrechamente relacionada con la actividad del cultivo iniciador, atribuida principalmente a *S. cerevisiae* 120, *L. plantarum* 14 y *L. fermentum* 16.

Estos resultados concuerdan con la enumeración de BAL, BAA y levaduras mostradas anteriormente (Apartado 5.3) Por lo tanto, asumimos que las diferencias en el perfil volátil entre las muestras inoculadas y las testigos están relacionadas con el crecimiento microbiana. Además, se ha especificado que los aldehídos durante el proceso de fermentación contribuyen a los atributos de notas dulces y tostadas, además de estar involucrados en la formación de compuestos como las pirazinas (Rodríguez-Campos *et al.*, 2012). En este contexto, se obtuvieron mejores resultados en términos de compuestos deseables al utilizar un consorcio iniciador.

5.8.2 Influencia del consorcio iniciador sobre el perfil de compuestos volátiles durante las etapas postfermentación

Los cambios en el perfil de los compuestos volátiles durante las etapas posteriores (secado, tostado y conchado) a la fermentación con y sin consorcio iniciador se analizaron mediante un análisis de mapa de calor de análisis de clústeres. La abundancia de entidades de metabolitos identificados tanto individualmente como agrupados por familias durante las diferentes etapas del procesamiento postfermentativo se muestra en la Figura 5.12. El mapa de calor reveló que el contenido de ácidos carboxílicos disminuyó durante la postfermentación en las muestras de cacao inoculado, principalmente por evaporación, hasta aproximadamente 1 % del contenido inicial (Ascrizzi *et al.*, 2017). Sin embargo, alrededor de 30 % del contenido inicial de ácidos carboxílicos (ácidos málico y láctico) prevaleció después de las operaciones postfermentación en las muestras testigo. La acumulación de los ácidos carboxílicos ha sido fuertemente implicada como la principal causa del sabor ácido en los productos finales (Meersman *et al.*, 2016; Assi-Clair *et al.*, 2019).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

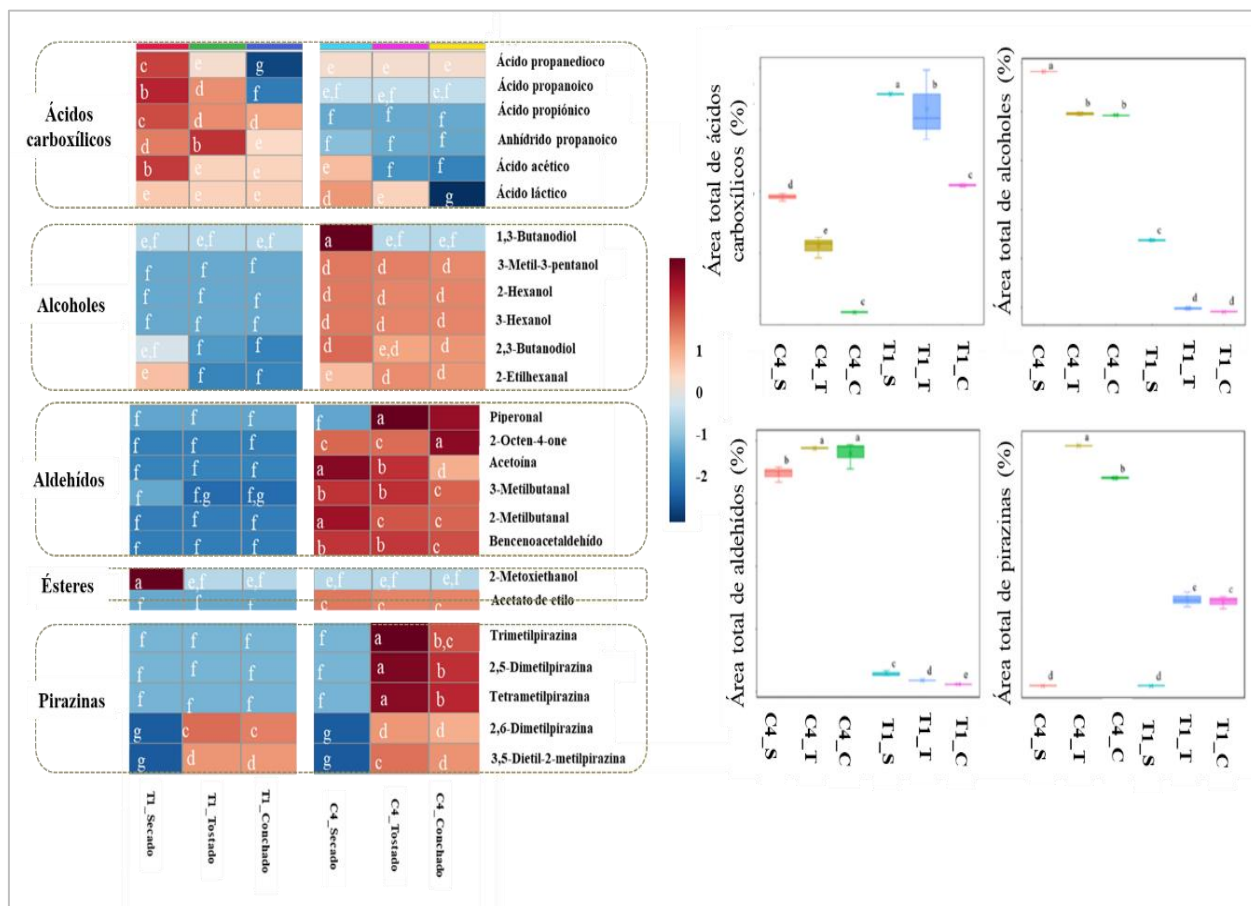


FIGURA 5.12 Cambios en los grupos de metabolitos durante la postfermentación de granos de cacao fermentados con (C4) y sin (T1) consorcio iniciador. La concentración relativa corresponde a la normalización por MSTUS, áreas de pico transformadas y escaladas.

Las diferencias de concentración de alcoholes, aldehídos y cetonas durante la fermentación fueron predominantes durante las operaciones postfermentación. Como ejemplo, alcoholes como el 3-metil-3-pentanol, el 2-hexanol, el 3-hexanol, el 2-3-butanediol y aldehídos como el 2-2-metilbutanal y el 3-metilbutanal, o cetonas como la octen-4-ona y la acetoína presentan cambios significativos tras las operaciones postfermentación en las muestras de cacao inoculado. Estos compuestos, asociados a atributos positivos en la calidad final del chocolate (Schwan y Wheals, 2004; Ascrizzi *et al.*, 2017), podrían perderse por degradación o volatilización durante el tostado a temperaturas superiores a 160 °C durante tiempos prolongados (más de 60 min) (Mohamadi Alasti *et al.*, 2019).

Por esta razón, en este estudio el tostado se realizó a 120 °C durante 45 min. Asimismo, desde las 120 h se identificó acetato de etilo en las muestras de cacao inoculado el cual se mantuvo constante. El acetato de etilo es generado por las levaduras a través del metabolismo secundario (Loviso y Libkind, 2019); por lo tanto, su presencia en las muestras de cacao inoculado podría atribuirse a *S. cerevisiae* 120. Destaca la formación de pirazinas en etapas postfermentativas, especialmente durante el tostado, que podrían producirse a partir de aldehídos o acetoína mediante la degradación no enzimática de Strecker y las reacciones de Maillard. Las pirazinas aportan notas positivas como chocolate, tostado y caramelo en el producto final (Mottram, 1993). En este estudio, la trimetilpirazina, la 2-5-dimetilpirazina y la tetrametilpirazina sólo se detectaron en las muestras de cacao inoculado, mientras que la 2,6-dimetilpirazina y la 3,5-dietil-2-metilpirazina se encontraron tanto en los granos de cacao inoculados como en los testigos durante el tostado y el conchado. Estas diferencias podrían atribuirse a una mayor presencia de algunos precursores como la acetoína, producida naturalmente por *Saccharomyces* durante la fermentación alcohólica.

5.9 Análisis de compuestos no volátiles

Los extractos de todas las muestras de cacao con consorcio iniciador y sin consorcio iniciador obtenidas durante la fermentación y postfermentación se analizaron mediante LC–QTOF en modo alta resolución, a través de un enfoque no dirigido. Con base a la información obtenida por MS/MS, un total de 69 compuestos polares y semipolares se identificaron. En la Tabla. 5.5, se muestran los compuestos polares/semipolares identificados clasificados por grupos químicos (aldehídos, alcaloides, azúcares, aminoácidos, ácidos carboxílicos, ácidos fenólicos, flavonoides, otros), también se enumera los principales parámetros sujetos a su identificación.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

TABLA 5.5 Compuestos polares/semipolares identificados a partir de granos de cacao fermentados sin consorcio iniciador (T1) y con el consorcio iniciador (C4) durante la fermentación (F) y postfermentación: D) Secado, (R) Tostado, (C) Conchado y (ND) No Detectado.

Grupo químico	Nombre del compuesto	Formula	Tiempo de retención (min)	Masa mono isotópica	Aducto	Ion precursor m/z	Fragmentos principales	Muestras	
								C4	T1
Aldehídos	3,4-Dihidroxibenzaldehído	C ₇ H ₆ O ₃	11.54	138.0319	[M-H] ⁻	137.0247	108.0237, 91.0196, 65.0042	F, S, T, C	F, S, T, C
	Indol-3-aldehído	C ₉ H ₇ NO	13.85	145.0526	[M-H] ⁻	144.0454	144.0443, 126.0345, 115.0419	F, S, T, C	F, S, T, C
Alcaloides	Teobromina	C ₇ H ₈ N ₄ O ₂	9.85	180.0647	[M+H] ⁺	181.0719	195.088, 138.066, 110.0714	F, S, T, C	F, S, T, C
	3-metilxantina	C ₆ H ₆ N ₄ O ₂	9.63	166.0493	[M-H] ⁻	165.0421	226.4928, 165.0424, 122.0362	F, S	F, S
	Cafeína	C ₈ H ₁₀ N ₄ O ₂	10.43	194.0802	[M+H] ⁺	195.0874	195.088, 138.066, 110.0713	F, S, T, C	F, S, T, C
	Trigonelina	C ₇ H ₇ NO ₂	3.34	137.0475	[M+H] ⁺	138.0547	138.0533, 94.0642, 78.0328	F, S, T, C	F, S, T, C
Aminoácidos y derivados	Glutamato	C ₅ H ₉ NO ₄	3.34	147.0531	[M+H] ⁺	148.0603	102.054, 84.0438, 56.0493	F, S, T, C	F, S, T
	Ácido piroglutámico	C ₅ H ₇ NO ₃	4.54	129.0425	[M+H] ⁺	130.0497	84.0456, 56.0503, 41.0391	F, S, T, C	F, S, T, C
	Fenilalanina	C ₁₂ H ₁₆ N ₂ O ₃	10.04	236.1168	[M+H] ⁺	237.124	120.0803, 103.0522, 44.0491	F	-
	Asparagina	C ₄ H ₈ N ₂ O ₃	3.25	132.0786	[M+H] ⁺	131.0714	74.0228, 70.0284, 44.9496	F, S, T, C	F, S, T, C
	Ácido aspártico	C ₄ H ₇ NO ₄	3.42	132.0301	[M+H] ⁺	131.0229	115.0016, 88.0405, 71.0146	F, S, T, C	F, S, T, C
	Leucina	C ₆ H ₁₃ NO ₂	5.41	131.0946	[M+H] ⁺	132.1018	86.0967, 69.0701, 44.0495	F, S, T, C	F, S, T, C
	Metilprolina	C ₆ H ₁₁ NO ₂	3.426	111.0922	[M+H] ⁺	112.0994	84.0814, 68.049, 42.0339	F, S, T, C	F, S, T, C
	Fenilalanina	C ₉ H ₁₁ NO ₂	9.82	165.0788	[M+H] ⁺	166.086	103.0534, 91.0532, 77.038	F, S, T, C	F, S, T, C
	Prolina	C ₅ H ₉ NO ₂	3.39	115.0633	[M+H] ⁺	116.0705	43.0544, 68.0497, 70.0657	F, S, T, C	F, S, T, C
	Serina	C ₃ H ₇ NO ₃	3.38	105.0425	[M-H] ⁻	104.0353	44.6007, 74.0258, 103.9203	F, S, T, C	F, S, T, C
	Triptófano	C ₁₁ H ₁₂ N ₂ O ₂	10.55	204.0895	[M+H] ⁺	205.0967	118.0637, 146.0575, 188.067	F, S, T, C	F, S, T, C

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

	Tirosina	C ₉ H ₁₁ NO ₃	6.96	181.0738	[M+H] ⁺	182.081	127.0787, 123.0436, 91.0535	F, S, T, C	F, S, T, C
	Valina	C ₅ H ₁₁ NO ₂	3.81	117.0791	[M+H] ⁺	118.0863	72.0794, 57.0569, 42.0339	F, S, T, C	F, S, T, C
Ácidos carboxílicos	3-Hidroxi-2-metilpiridina	C ₆ H ₇ NO	3.78	109.0527	[M+H] ⁺	110.0599	110.0603, 94.0288, 82.0657	F, S, T, C	F, S, T, C
	Ácido hidroxifenilpirúvico	C ₉ H ₈ O ₄	13.23	180.0422	[M-H] ⁻	179.035	179.033, 136.458, 109.0293	F, S, T	F
	Ácido cinámico	C ₉ H ₈ O ₂	8.7	148.0524	[M+H] ⁺	149.0596	105.0331, 77.0397, 51.0295	F	F
	Ácido málico	C ₄ H ₆ O ₅	4.47	134.0218	[M-H] ⁻	133.0146	115.0017, 71.0144, 43.0192	F, S, T, C	F, S, T, C
	Ácido shikímico	C ₇ H ₁₀ O ₅	3.97	174.0528	[M-H] ⁻	173.0456	93.0348, 73.0309, 43.0203	F, S, T, C	F, S, T, C
	Ácido cítrico	C ₆ H ₈ O ₇	5.69	192.0277	[M-H] ⁻	191.0205	111.0094, 87.0089, 57.0352	F, S, T, C	F, S, T, C
	Ácido galactárico	C ₆ H ₁₀ O ₈	3.57	210.0377	[M-H] ⁻	209.0305	85.0305, 71.015, 59.0151	F, S, T, C	F, S, T, C
	Ácido glucónico	C ₆ H ₁₂ O ₇	3.54	196.0588	[M-H] ⁻	195.0516	75.0095, 59.0151, 41.0046	F, S, T, C	F, S, T, C
	Ácido hidroxifenilacético	C ₈ H ₈ O ₃	11.1	152.9473	[M-H] ⁻	151.9401	107.0509, 77.0396, 41.9991	F, S, T, C	F, S, T, C
	Ácido quínico	C ₇ H ₁₂ O ₆	3.73	192.0632	[M-H] ⁻	191.056	191.0569, 85.031, 59.015	F, S, T, C	F, S, T, C
	Ácido tartárico	C ₄ H ₆ O ₆	3.73	150.0169	[M-H] ⁻	149.0097	87.0088, 72.9927, 59.0146	F, S, T, C	F, S, T, C
Polifenoles, flavonoides y derivados	Epicatequina	C ₁₅ H ₁₄ O ₆	10.92	290.0789	[M+H] ⁺	291.0861	207.0642, 139.0388, 123.0441	F, S, T, C	F, S, T, C
	Luteolina	C ₁₅ H ₁₀ O ₆	14.06	286.0476	[M-H] ⁻	285.0404	285.0407, 133.0303, 65.004	F, S, T, C	F, S
	Luteolina-7-glucósido	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₁	11.75	448.1005	[M-H] ⁻	447.0933	447.091, 285.0374, 284.0294	F, S, T, C	F, S
	Procianidina C1	C ₄₅ H ₃₈ O ₁₈	10.48	866.2046	[M+H] ⁺	867.2118	715.168, 579.1532, 409.0916	F, S, T, C	F, S, T, C
	Apigenina	C ₁₅ H ₁₀ O ₅	14.49	270.0776	[M-H] ⁻	269.0704	269.044, 225.0545, 151.0034	F, S, T, C	F
	Apigenina-glucósido	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₀	11.61	432.1056	[M-H] ⁻	431.0984	431.0967, 311.0554, 282.0503	F, S, T, C	F
	Catechin	C ₁₅ H ₁₄ O ₆	11.31	290.0791	[M-H] ⁻	289.0719	289.0709, 151.0395, 123.0451	F, S, T, C	F, D
	Catequina-glucósido	C ₁₂ H ₂₄ O ₁₁	10.38	452.1324	[M-H] ⁻	451.1252	289.0707, 245.0813, 179.0341	F	F
	Kaempferol-rutinósido	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₅	11.45	594.1581	[M-H] ⁻	593.1509	593.1509, 285.0406	F, S, T, C	F, S, T, C

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

	Naringenina	C ₁₅ H ₁₂ O ₅	14.55	272.0684	[M-H] ⁻	271.0612	271.0579, 151.0029, 65.0021	F, S, T, C	F
	Naringenina-7-O-rutinósido	C ₂₇ H ₃₂ O ₁₄	11.95	580.1798	[M-H] ⁻	579.1726	579.1728, 271.0604, 151.0025	F, S, T, C	F
	Procianidina B1	C ₃₀ H ₂₆ O ₁₂	10.99	578.143	[M-H] ⁻	577.1358	407.0837, 289.0726, 125.0253	F, S, T, C	F, S, T, C
	Procianidina B2	C ₃₀ H ₂₆ O ₁₂	11.8	578.1422	[M-H] ⁻	577.135	407.0837, 289.0726, 125.0253	F, S, T, C	F, S, T, C
	Quercetina	C ₁₅ H ₁₀ O ₇	14.13	302.0435	[M-H] ⁻	301.0363	301.0352, 151.0035, 107.014	F, S, T, C	F, S, T, C
	Quercetina 3-arabinósido	C ₂₀ H ₁₈ O ₁₁	12.24	434.0852	[M-H] ⁻	433.078	300.0272, 271.0247, 255.03	F, S, T, C	F, S, T, C
	Quercetina 3-β-D-glucósido	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₂	11.8	464.0959	[M-H] ⁻	463.0887	463.092, 300.0301, 151.0033	F, S, T, C	F, S, T, C
	Taxofilina	C ₁₅ H ₁₂ O ₇	12.986	304.058	[M-H] ⁻	303.0508	285.0386, 217.0549, 125.0248	F, S, T, C	F, D
Ácidos fenólicos	Ácido clorogénico	C ₁₆ H ₁₈ O ₉	3.6	354.0982	[M-H] ⁻	353.091	353.099, 191.0382, 59.0142	F	-
	Ácido p-cumárico	C ₉ H ₈ O ₃	4.77	164.0468	[M+H] ⁺	165.054	119.0774, 77.0382, 21.0534	F	F
Azúcares	Estaquiosa	C ₂₄ H ₄₂ O ₂₁	3.53	666.2222	[M-H] ⁻	665.215	665.2141, 485.1497, 383.1176	F, S, T, C	F, S, T, C
	Rafinosa	C ₁₈ H ₃₂ O ₁₆	3.61	504.17	[M-H] ⁻	503.1628	503.1563, 119.0336, 89.0253	F, S, T, C	F, S, T, C
	Sacarosa	C ₁₂ H ₂₂ O ₁₁	3.69	342.117	[M-H] ⁻	341.1098	89.0258, 71.0148, 59.0153	F, S, T, C	F, S, T, C
	Maltotriosa	C ₁₈ H ₃₂ O ₁₆	3.61	504.1696	[M-H] ⁻	503.1624	383.1217, 179.0553, 89.0235	F, S, T, C	F, S, T, C
Otros	Ácido dodeca-2(E),4(E)-dienoico isobutilamida	C ₁₆ H ₂₉ NO	17.77	251.2247	[M+H] ⁺	252.2319	95.0863, 67.0546, 41.0376	F	F
	Ácido 4-Guanidinobutanoico	C ₅ H ₁₁ N ₃ O ₂	3.61	145.0849	[M+H] ⁺	146.0921	146.0908, 86.0605, 45.0333	F, S, T, C	F, S, T, C
	Ácido murámico	C ₉ H ₁₇ NO ₇	3.34	251.1004	[M+H] ⁺	252.1076	126.0543, 56.0501, 44.0496	F, S, T, C	F, S, T, C
	Ácido pantoténico	C ₉ H ₁₇ NO ₅	9.97	219.1109	[M+H] ⁺	218.1037	146.0829, 88.0408, 71.0507	F, S, T, C	F, S, T, C
	Sulfo jasmonato	C ₁₂ H ₁₈ O ₇ S	11.14	306.0776	[M-H] ⁻	305.0704	305.0702, 96.9602, 59.0144	F, S, T, C	F, S, T, C
	Tetrametilpirazina	C ₈ H ₁₂ N ₂	10.77	136.0999	[M+H] ⁺	137.1071	137.107, 96.0811, 55.0441	F, S, T, C	F, S, T, C
	Adenina	C ₅ H ₅ N ₅	3.56	135.0545	[M+H] ⁺	136.0617	136.0618, 119.0351, 94.0387	F, S, T, C	F, S, T, C

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

	Colina	C ₅ H ₁₃ NO	3.2	103.0998	[M+H] ⁺	104.107	104.1074, 60.0813, 45.0335	F, S, T, C	F, S, T, C
	Guanina	C ₅ H ₅ N ₅ O	3.81	151.0492	[M+H] ⁺	152.0564	152.0569, 132.0303, 110.0353	F, S, T, C	F, S, T, C
	Guanosina	C ₁₀ H ₁₃ N ₅ O ₅	3.83	283.0914	[M+H] ⁺	284.0986	152.0563, 135.0299, 110.0351	F, S, T, C	F, S, T, C
	Indolina	C ₈ H ₉ N	8.64	119.0736	[M+H] ⁺	120.0808	121.0516, 118.0659, 103.0551	F, S, T, C	F, S, T, C
	Linoleoyl ethanolamide	C ₂₀ H ₃₇ NO ₂	19.39	323.2813	[M+H] ⁺	324.2885	323.2571, 81.0707, 62.0589	F	F
	Lisofosfatidilcolina 18:2	C ₂₆ H ₅₀ NO ₇ P	19.47	519.3328	[M+H] ⁺	520.34	520.3471, 502.3261, 184.075	F, S, T	F
	Cumarina	C ₉ H ₆ O ₂	11	146.0365	[M+H] ⁺	147.0437	91.0536, 65.0393, 51.0233	F, S, T, C	F, S, T, C
	Cumarina	C ₇ H ₆ O ₂	12.88	122.037	[M-H] ⁻	121.0298	121.0307, 92.0277, 41.0032	F, S, T, C	F, S, T, C
	Niacina	C ₆ H ₅ NO ₂	4.39	123.032	[M+H] ⁺	124.0392	124.0385, 80.049, 53.0383	F, S, T, C	F, S, T, C

5.9.1 Cambios en los compuestos polares/semipolares durante la fermentación mediante análisis no dirigido

El efecto del consorcio iniciador sobre la evolución de compuestos polares y semipolares durante la fermentación de granos de cacao se estudió mediante PCA, para observar las diferencias en el perfil de los compuestos no volátiles. El gráfico de PCA (Figura 5.13-A) explicó 86.3 % de la variabilidad total (PC1 = 61.1 %; PC2 = 25.2 %) y al comparar ambas fermentaciones (cacao inoculado con consorcio C4 y testigo) en función del tiempo evidenció que éstas comparten el mismo punto de inicio debido a que los metabolitos intrínsecos de la variedad de grano son los mismos; es a partir de las 24 h que se exhibe una mayor diferenciación, lo que produce perfiles de compuestos diferentes entre ellas hasta el final de la fermentación.

El análisis de los gráficos de carga (Figura 5.13-B) mostró que las muestras de cacao inoculado mostraron un mayor contenido de aminoácidos (triptófano, asparagina, fenilalanina, tirosina, prolina, leucina glutamato y valina), flavonoides (epicatequina, procianidina B1, B1 y C1) y ácidos cítricos, shikímico y cinámico, revelando que, a partir de la fermentación intermedia, son éstos los principales responsables de las separaciones con respecto a las muestras testigo. Este comportamiento se confirmó mediante un análisis de clústeres (Figura 5.13-C), el cual representa simultáneamente las concentraciones relativas de algunos metabolitos identificados, tanto individualmente como agrupados en familias químicas. En el centro del gráfico se muestra el punto inicial de la fermentación de ambos tratamientos, a medida que avanza la fermentación, las muestras se desplazan hacia puntos diferentes indicando que podría ser el resultado del uso del consorcio iniciador el cual influye sobre los compuestos polares/semipolares.

El análisis de clústeres reveló que los alcaloides, polifenoles, aminoácidos, carbohidratos y ácidos (carboxílicos, fenólicos) exhibieron cambios en la concentración relativa durante las fermentaciones.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

no se ha informado que los alcaloides sufran transformaciones químicas durante la fermentación, la disminución se ha relacionado con la migración y exudación de las metilxantinas (p. ej. teobromina, cafeína) del cotiledón a la cáscara y el metabolismo de las levaduras podría facilitar su liberación (Nazaruddin *et al.*, 2006; Celso *et al.*, 2021) o incluso se podría suponer que existe una difusión hacia el mucílago, los cuales se solubilizan por la presencia de alcoholes. Respecto al testigo, se registró una disminución del 0.83 % desde el principio hasta el final de la fermentación.

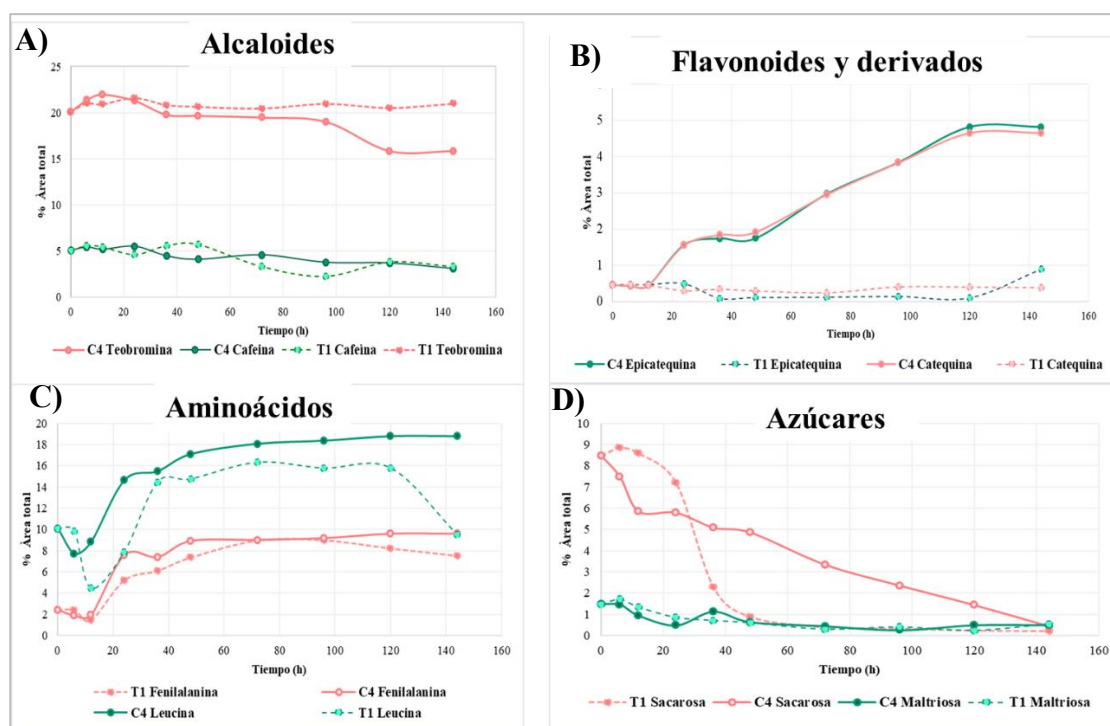


FIGURA 5.14 Evolución de alcaloides (A), flavonoides y derivados (B), aminoácidos (C) y azúcares (D) durante la fermentación de los granos de cacao con (C4) y sin (T1) consorcio iniciador.

Se identificaron 21 polifenoles clasificados en: a) flavonoides (procianidina, quercetina, taxfolin, catequina, epicatequina), b) flavonas (luteolina, apigenina, kaempferol, naringenina y sus derivados glucósido, rutinósido, arabinósido) y c) ácidos fenólicos (*p*-cumárico y clorogénico). Estos compuestos polifenólicos aumentaron tras 24 h de

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

fermentación con cacao inoculado, alcanzando una concentración máxima de 44.6 % hacia el final de la fermentación. La Figura 5.14-B muestra el rápido aumento de la epicatequina y la catequina, que resultaron ser los más abundantes. Este incremento de polifenoles se ha reportado anteriormente en fermentaciones con cacao inoculado, que eventualmente podría atribuirse a microorganismos como *P. kudriavzevii*, *H. thailandica* y *S. cerevisiae* que hidrolizan los compuestos fenólicos insolubles de alto peso molecular produciendo fenoles solubles libres y simples, aumentando su disponibilidad (Haile, 2019; Ooi *et al.*, 2020; Celso *et al.*, 2021). En las muestras testigo el contenido polifenólico, se mantuvo constante durante las primeras 24 h de fermentación, después disminuyó aproximadamente 11.4 %, este comportamiento se relaciona con la fase aeróbica-oxidativa, siendo las catequinas uno de los principales flavonoides sujetos a oxidación como resultado de la actividad de la polifenol oxidasa. Por otro lado, se ha demostrado que los aminoácidos y carbohidratos tienen una correlación significativa con la formación de sabores y aromas en el cacao, debido al impacto que tienen en las etapas postfermentativas actuando como precursores (Apriyanto & Harmayani, 2017). Todos los aminoácidos de este estudio se identificaron con la forma del aducto $[M+H]^+$ en modo positivo y los di, tri y tetrasacáridos en modo de ionización negativa, con el ion $[M-H]^-$. Hasta esta investigación, no se dispone de información científica sobre el perfil de oligosacáridos en fermentaciones inducidas por consorcios iniciadores. El contenido inicial de aminoácidos, en todas las cajas fue de 18.9 %, la fenilalanina y leucina disminuyeron 1.8 % en la fermentación con cacao inoculado y 8.9 % en el cacao testigo, respectivamente, hasta las 12 h (Figura 5.14-C). Este comportamiento en fermentaciones endógenas de cacao, se atribuye al metabolismo de carbono y nitrógeno (Castro-Alayo *et al.*, 2019; Deus *et al.*, 2020). A las 24 h se produjo un primer incremento de 13.6 % de los aminoácidos glutamato, leucina, fenilalanina, tirosina, valina, triptófano, asparagina y serina y a las 48 h volvió a aumentar 4.3 %, manteniéndose después constante con una concentración total de 35.1 % hasta el final de la fermentación de cacao inoculado. En el testigo, los aminoácidos glutamato, ácido aspártico, leucina y fenilalanina aumentaron 9.3 % a las 24 h, exponiendo al final de la fermentación una concentración de 21.5 %. Las concentraciones relativas resultaron más bajas en comparación con las muestras tratadas con

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

el consorcio iniciador; este efecto podría deberse a una mayor actividad enzimática impulsada por los microorganismos iniciadores. Si existe un predominio de la actividad microbiana de levaduras y BAA durante la fermentación intermedia (después de las 24 h), pueden favorecer a la activación de enzimas proteolíticas endógenas y microbianas, debido al aumento de temperatura como acción de las reacciones exotérmicas y a la disminución del pH inducida por ácidos orgánicos (Deus *et al.*, 2020; Liu *et al.*, 2020). La actividad de algunas enzimas como la endoproteasa aspártica y la carboxipeptidasa produce la hidrólisis de péptidos y liberación de aminoácidos como fenilalanina, tirosina y leucina (Castro-Alayo *et al.*, 2019; Spizzirri *et al.*, 2019; Voigt *et al.*, 2003), todos ellos identificados en este estudio, los cuales son precursores desarrollados durante la fermentación que contribuyen a la formación del aroma del cacao en las etapas subsecuentes de procesamiento. Además, al aumentar la concentración relativa de aminoácidos como la fenilalanina, tirosina y triptófano, estos podrían condensarse en compuestos fenólicos, mediante la vía del ácido shikímico aumentando la concentración de flavonoides (Ledesma-Escobar *et al.*, 2017), completando otra posible alternativa sobre aumento de flavonoides reportado en este estudio durante la fermentación intermedia.

De los carbohidratos, la sacarosa predominó en el cotiledón en todas las muestras, con un contenido inicial de 8.4 %, para luego disminuir gradualmente hasta alcanzar 0.4 % en las muestras de cacao inoculado y 0.2 % en el testigo (Figura 5.14-D), como consecuencia de la actividad hidrolítica durante esta fase como algunos estudios han documentado (Gil *et al.*, 2020; Megias-Perez *et al.*, 2020). Los tri-tetrasacáridos también exhibieron una disminución, la maltotriosa disminuyó a partir de 12 h de fermentación en cacao inoculado, mientras que en el testigo se observó un comportamiento sinuoso. La rafinosa y estaquiosa disminuyeron significativamente después de las 36 h, y su contenido fue ligeramente superior en la fermentación testigo. Las posibles diferencias entre los niveles de azúcar se han relacionado con la actividad enzimática nativa en el grano de cacao, que se activa de acuerdo a las condiciones de aireación, temperatura y pH, que se modifican como consecuencia de la actividad microbiana en el mucílago.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los ácidos carboxílicos son los principales compuestos asociados a los cambios de pH en los granos de cacao durante la fermentación. Además de la presencia de los principales ácidos asociados al metabolismo microbiano como el láctico y el acético, se identificaron 10 ácidos, 2 en modo de ionización positiva y 8 en negativa, con la forma de aducto $[M+H]^+$ y $[M-H]^-$. Los ácidos málico, tartárico y galactárico alcanzaron su concentración máxima a las 120 h, 11.8 % (muestras de cacao inoculado) y 15.5 % (testigo); poco se ha mencionado del comportamiento de estos ácidos en estudios anteriores, sin embargo, de acuerdo a lo referenciado por Camu *et al.* (2008b), los ácidos cítrico, málico y tartárico se encuentran presentes aun después de la fermentación. En general, el ácido cítrico fue el principal ácido en las muestras de cacao inoculado, el aumento gradual de su concentración podría explicarse por el hecho de que, se ha reportado, algunas especies de levaduras son productoras de ácido cítrico (Anastassiadis, 2006); posiblemente *S. cerevisiae* 120 tenga esa capacidad. El ácido cítrico producido pudo haber migrado hacia el interior del grano como sucede con los ácidos volátiles, que se desarrollan principalmente a través de diversas acciones de microorganismos en el mucílago y luego se difunden en el cotiledón. Por otro lado, el aumento significativo a las 12 h del ácido shikímico, se podría relacionar con el aumento de tirosina y fenilalanina, así como de los ácidos clorogénico y *p*-cumárico durante la fermentación intermedia de granos de cacao inoculados, dado que el ácido shikímico es precursor de aminoácidos y flavonoides por mencionar algunos. Los resultados de este trabajo sugieren que la fermentación inducida por el consorcio iniciador puede ejercer efecto sobre el aumento de los compuestos fenólicos, que contribuyen a la actividad antioxidante mediante la eliminación de radicales libres en función de su capacidad de donación de electrones, además de promover el desarrollo de precursores de aroma y sabor que luego tendrán un impacto en las etapas subsecuentes de procesamiento.

5.9.2 Cambios en la fracción polar/semipolar durante el procesamiento post-fermentativo de los granos de cacao

Se estudió la abundancia de las entidades de metabolitos identificados, tanto individualmente como agrupados por familias durante las diferentes etapas del

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

procesamiento postfermentativo (Figura 5.15). Durante las etapas de secado y tostado, el contenido de alcaloides disminuyó 4 % en el grano de cacao C4, mientras que en el T1 la pérdida entre estas etapas fue de 11.8 %, esto puede relacionarse con el tratamiento térmico durante el tostado (Afoakwa *et al.*, 2008), además en esta etapa, la teobromina y la cafeína forman aductos con dicetopiperazinas, otorgando un amargor específico en los granos de cacao tostado (Voigt *et al.*, 2003). Tanto en el licor C4 como en el T1, no se observaron cambios significativos durante el conchado, por lo tanto, la elevación de temperatura ocasionada por el proceso de refinación no tuvo efecto sobre el contenido de alcaloides.

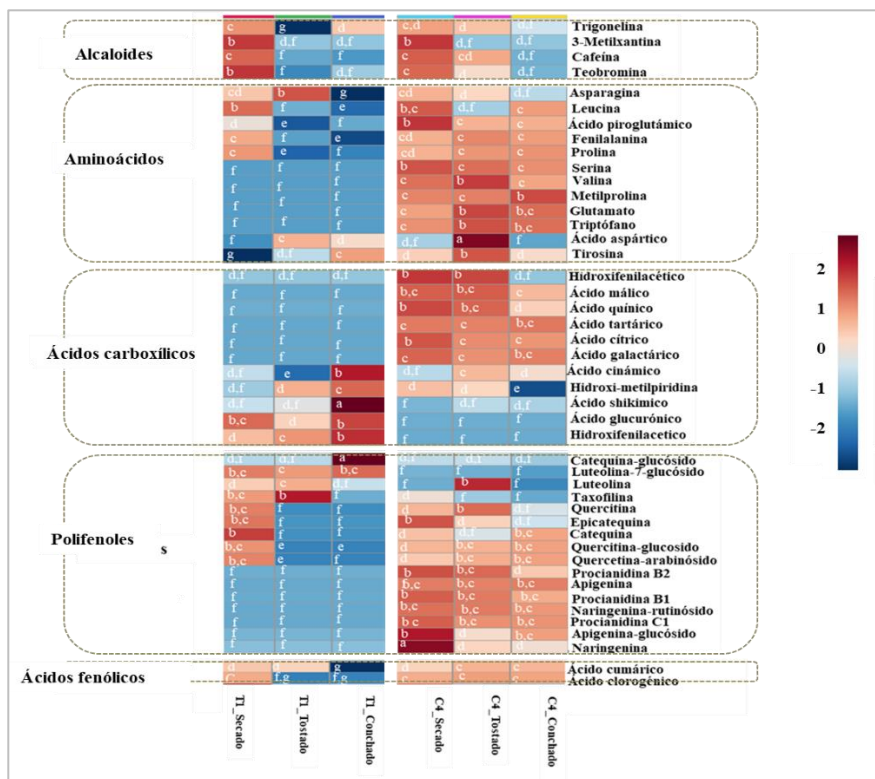


FIGURA 5.15 Cambios en los grupos de compuestos polares/semipolares durante el procesamiento postfermentativo de los granos de cacao fermentados con (C4) y sin (T1) consorcio iniciador. La concentración relativa corresponde a la normalización por MSTUS, áreas de pico transformadas y escaladas.

El contenido polifenólico se redujo en las etapas posteriores al secado (12.4 %), tostado (8.8 %) y conchado (7.9 %) en el grano de cacao C4; comportamiento que se observó

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

en el cacao T1 (secado 9 %, tostado 7.8 % y conchado 6.8 %). A pesar de la reducción durante el procesamiento, la diferencia relacionada con una mayor concentración de polifenoles en C4, con respecto al T1, puede deberse al aumento significativo producido durante la fermentación C4. En investigaciones previas, se ha documentado el aumento de los compuestos polifenólicos: epicatequina y catequina en fermentaciones con *L. fermentum* M017, *S. cerevisiae* H290 y *L. fermentum* 223 y una disminución de polifenoles durante el secado (Romanens *et al.*, 2020). En general, la reducción en el contenido polifenólico durante las etapas de procesamiento puede atribuirse al hecho de que la polifenoloxidasas todavía activa durante el secado, cataliza la transformación de los polifenoles en quinonas, que luego se condensan con los grupos amino libres y sulfuro de hidrógeno, dando lugar a la formación de polímeros marrones y a una reducción del amargor y la astringencia (Voigt *et al.*, 2003; Aprotosoai *et al.*, 2016; Kongor *et al.*, 2016). En el tostado, las altas temperaturas afectan significativamente el contenido y la composición de moléculas termolábiles como los polifenoles, además existen reacciones de polimerización (Caligiani *et al.*, 2016; Mohamadi Alasti *et al.*, 2019). Algunos autores han señalado que el proceso de conchado no afecta significativamente el contenido polifenólico, sin embargo, éstos pueden llegar a perderse por evaporación, junto con el agua y los ácidos grasos de cadena corta (Afoakwa *et al.*, 2008; Mattia *et al.*, 2017). De acuerdo a lo mencionado por Afoakwa *et al.* (2008) y Aprotosoai *et al.* (2016), los péptidos hidrófilos, aminoácidos libres hidrófobos y azúcares reductores, contribuyen a la producción de compuestos aromáticos volátiles, durante la fermentación se desarrollan individualmente y en el secado inician su interacción con otros componentes de los granos de cacao para posteriormente desarrollarse por completo a través de las reacciones de Maillard y degradación de Strecker durante el proceso de tostado y conchado (Crafack *et al.*, 2014; Kongor *et al.*, 2016). En todas las etapas postfermentativas se encontraron diferencias en la concentración relativa de aminoácidos y azúcares entre C4 y T1. La mayor concentración relativa de aminoácidos se encontró en las muestras de cacao fermentado con C4 durante el secado (33.3 %); tostado (31.4 %) y conchado (30.7 %), indicando concentraciones más bajas en T1 (secado 25.4 %; tostado 12.6 % y conchado 11.7 %), en general, los aminoácidos disminuyeron ligeramente a partir del secado. Zzaman *et al.* (2013),

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

estableció que el comportamiento de los aminoácidos es consecuencia de la degradación de Strecker.

Con respecto al contenido de azúcares, el T1 exhibió concentraciones más elevadas en el secado (5.7 %); tostado (5.3 %) y conchado (5.2 %), mientras para C4 se encontraron concentraciones menores a 4.9 % y 4.3%. Aunque se detectaron niveles más bajos de azúcares en el cacao C4, existen otros determinantes que pueden influenciar la formación de compuestos relevantes para el cacao, tal es el caso de los aminoácidos. En el cacao seco, tostado y conchado C4, la leucina predominó en concentraciones de 11.8 % y 14.12 %, seguido de la fenilalanina (10.5 % y 8.9 %), valina (5.3 % y 2.5 %), prolina (2.7 % y 1.8 %), glutamato (2.2 % y 1.1 %) y serina (0.4 % y 0.3 %) en C4 y T1, respectivamente. Autores como Castro-Alayo *et al.* (2019) han informado que la leucina es responsable de la producción de notas aromáticas descritas como chocolate dulce. Por otro lado, la prolina y la serina, están considerados como aminoácidos dulces (Deus *et al.*, 2020); la fenilalanina y valina, además de caracterizarse por los atributos amargos, son precursores de 3-metilbutanal y 2-metilbutanal, a través de la vía de degradación de Strecker (Crafack *et al.*, 2014), estos aldehídos fueron particularmente predominantes desde la fermentación C4 hasta el conchado; en un estudio previo, estos aportan aroma afrutado, además de sabores a miel y floral. También se identificó pirrol en todas las muestras de cacao tostado y licor de cacao C4, como producto de la prolina, el cual se ha reportado en café mediante la descomposición térmica de la trigonelina (Wei *et al.*, 2015), alcaloide presente en todas las muestras C4. En general, la concentración de ácidos mostró una disminución de 1.9 % y 4.1 % a partir del secado hasta el conchado en el grano C4 y T1, respectivamente, esta disminución de la acidez ha sido citada en diferentes estudios (García-Alamilla *et al.*, 2007; Afoakwa *et al.*, 2008). La velocidad de secado y los tratamientos térmicos durante el tostado y el conchado, promueven la reducción de las concentraciones de ácidos volátiles, que en ocasiones puede dar lugar a sabores desagradables. Sin embargo, el ácido cítrico se considera un contribuyente del sabor con un efecto positivo, en C4 se encontró presente en concentraciones superiores a 6.3 % durante el secado, 5.3 % en tostado y 4.9 % en conchado, por arriba de T1. De acuerdo a lo

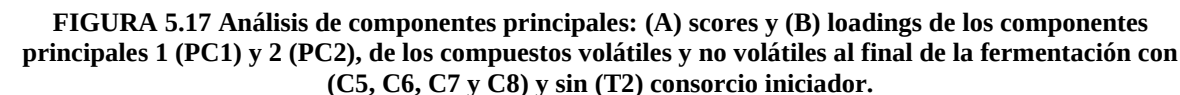
informado por Camu *et al.* (2008b), Lefeber *et al.* (2012) y Ho *et al.* (2014), las BAL y las levaduras utilizan ácido cítrico para producir acetaldehído, acetoína y 2,3-butanodiol, compuestos volátiles aromáticos identificados en concentraciones elevadas durante todas las etapas en el cacao C4. En lo que respecta a los ácidos málico y tartárico identificados en concentraciones menores, Dimick (1990) reportó la presencia de estos mismos ácidos a nivel traza en cacao seco, sin embargo, aún falta por estudiar a detalle el comportamiento de los ácidos quínico, shikímico, cinámico y galactárico durante las etapas de postprocesado.

The diagram illustrates the metabolic pathways of plant secondary metabolites, showing the conversion of primary metabolites into various secondary metabolites. Key pathways include:

- Lipid Metabolism:** Glutamate is converted to Acetyl-CoA, which then leads to the synthesis of fatty acids (Acido esteárico, Acido oleico, Acido linoleico, Acido araquidónico) and terpenoids (2-hexanol, 3-hexanol, 1-octen-3-ol).
- Amino Acid Metabolism:** Amino acids like Valina, Tirosina, Fenilalanina, and Asparagina are converted to Acetyl-CoA or other intermediates.
- Carbohydrate Metabolism:** Glucose is converted to Xantósina, Sacarosa, and Fructosa. Fructose is converted to (R)-3-Hydroxybutanal and then to 1,3-butanediol and 2,3-butanediol.
- Phenolic Compounds:** Acetyl-CoA leads to Acetoaldehído, which is converted to Acido acético and then to Acetato de etilo.
- Alkaloids:** Xantósina is converted to Teobromina and then to 3-Metilxantina.
- Other Compounds:** Acetoaldehído is converted to Acetoina, which is then converted to Tetrametilpirazina, 2,6-dimetilpirazina, and 2,5-dimetilpirazina.
- Flavonoids:** Acetyl-CoA leads to Acetoaldehído, which is converted to Acido acético and then to Acetato de etilo.
- Polyphenols:** Acetyl-CoA leads to Acetoaldehído, which is converted to Acido acético and then to Acetato de etilo.
- Terpenoids:** Acetyl-CoA leads to Acetoaldehído, which is converted to Acido acético and then to Acetato de etilo.
- Other Compounds:** Acetyl-CoA leads to Acetoaldehído, which is converted to Acido acético and then to Acetato de etilo.

FIGURA 5.16. Esquema general de síntesis de compuestos en cacao.

El punto final de la fermentación (144 h) del cacao inoculado con los consorcios C5, C6, C7 y C8 (cosecha abril-2019) y T2 (fermentación testigo), se examinó mediante PCA. En la Figura 5.17 se muestra en primer lugar, que el 57.7 % de la variación es explicada con los dos primeros componentes (PC1 = 34.9 % PC2 = 22.8 %), con respecto a los cambios en el perfil de volátiles.



RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Mientras que, para los compuestos no volátiles, el PCA explicó el 54.8 % de la variabilidad por medio de los componentes PC1 (37.7 %) y PC2 (17.1 %). Tanto para el perfil de compuestos volátiles como para el de compuestos no volátiles, se observó la formación de grupos de acuerdo a cada tipo de fermentación. El primer grupo referenciado como fermentación testigo (T2) se caracterizó principalmente por la presencia de ácidos carboxílicos como ácidos láctico y propanoico, que han demostrado que confieren notas negativas a rancio y agrio. El consorcio C5, indujo compuestos como: 2-hexanol, 3-hexanol, 1-octen-3-ol, 2-metil-1-propanal, 2,3-butanodiol (isom), pentanal, 2,3-metilbutanal, glutamato y serina, estos compuestos se han relacionado con atributos a malta, chocolate, almendra, dulce, flora, verde, frutal (Assi-Clair *et al.*, 2019; Rodríguez-Campos *et al.*, 2011), además algunos compuestos como el 2-hexanol, 3-hexanol y 1-octen-3-ol, pueden producirse mediante la biosíntesis de ácidos grasos de cadena larga. El consorcio C6, a pesar de incluir dos levaduras comerciales caracterizadas principalmente por la formación de ésteres, estos no se percibieron, se observó la presencia de ácidos, un aldehído (bencenoacetaldehído) relacionado por una nota a vegetales verdes (Menezes *et al.*, 2016; Cevallos-Cevallos *et al.*, 2018; Moreira *et al.*, 2018), además de azúcares como estaquiosa y maltotriosa.

El consorcio C7, indujo la presencia de compuestos como heptanal, decanal y 2-hexanol, caracterizados por notas a cítrico, caramelo, floral, chabacano y nuez. El cacao inoculado con consorcio C8 presentó compuestos relacionados con atributos a mantequilla, dulce, cítrico y almendra, contrarrestando las notas negativas del ácido succínico y de 2-octen-4ona a levadura (Acierno *et al.*, 2016; Assi-Clair *et al.*, 2019) y la presencia de epicatequina y procianidinas (B1 y B2), se puede considerar que el uso de diferentes consorcios podría tener un efecto en la formación de compuestos y por lo tanto podrían desarrollar aromas y sabores característicos.

6. CONCLUSIONES

Los recuentos celulares de levaduras, BAL y BAA indicaron que las fermentaciones con consorcios iniciadores comenzaron con concentración de 10^9 y 10^{10} UFC/mL de pulpa-cotiledón, lo que corresponde con los niveles de inóculo adicionados, permitiendo a las levaduras y las AAB dominar y prevalecer en mayor cantidad que en las fermentaciones endógenas.

El aumento de la temperatura y el descenso del pH del cotiledón indicaron que se produjeron cambios bioquímicos significativos, lo que se reflejó en la prueba de corte. Los atributos sensoriales en licor de cacao revelaron que el uso de los consorcios iniciadores desarrolló atributos deseables en el grano de cacao mostrando notas dulces y frutales en comparación con la fermentación endógena, la cual dio como resultado atributos positivos poco perceptibles.

Hasta donde se sabe, los resultados de este estudio representan el primer análisis metabolómico no dirigido en cacao mexicano inducido por consorcios iniciadores en volúmenes comerciales, desde la fermentación hasta el licor de cacao. Con la información obtenida por MS se identificaron en total 48 compuestos volátiles y por MS/MS 61 compuestos polares/semipolares. Estos revelaron claras diferencias entre las muestras fermentadas por un consorcio iniciador y con la microbiota nativa, destacando un mayor contenido de compuestos volátiles deseables como alcoholes y aldehídos en las muestras de cacao inoculado, favoreciendo al alto contenido de pirazinas tras las etapas de postfermentación (secado, tostado y conchado) por reacciones de Maillard y degradación de Strecker.

En términos de compuestos no volátiles, los polifenoles y aminoácidos predominaron en la fermentación con consorcio iniciador alcanzando un máximo durante la fermentación intermedia, mientras que los alcaloides disminuyeron consecutivamente desde la fermentación hasta el tostado. En general, en todas las etapas postfermentativas de cacao inoculado se observó la presencia de metabolitos deseables como la fenilalanina, valina, prolina, glutamato y serina, precursores de aldehídos aromáticos (acetaldehído, acetoina y 2,3-butanodiol). Por el contrario, la fermentación endógena reflejó concentraciones más bajas de aminoácidos y polifenoles.

Estos resultados indican que la aplicación de consorcios iniciadores, en concentraciones superiores a 10^9 - 10^{10} UFC en volúmenes comerciales de cacao y el correcto procesamiento postfermentativo permite potenciar las características sensoriales positivas.

7. BIBLIOGRAFÍA

- Acierno, V., Yener, S., Alewijn, M., Biasioli, F., y Van Ruth, S. 2016. Factors contributing to the variation in the volatile composition of chocolate: Botanical and geographical origins of the cocoa beans, and brand-related formulation and processing. *Food Research International* 84, 86–95.
- Adler, Philipp, Lasse Jannis Frey, Antje Berger, Christoph Josef Bolten, Carl Erik Hansen, and Christoph Wittmann. 2014. “The Key to Acetate: Metabolic Fluxes of Acetic Acid Bacteria under Cocoa Pulp Fermentation-Simulating Conditions.” *Applied and Environmental Microbiology* 80(15):4702–16.
- Afoakwa, E. O., Paterson, A., Fowler, M., y 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.
- Agyirifo, D. S., Wamalwa, M., Otwe, E. P., Galyuon, I., Runo, S., Takrama, J., y Ngeranwa, J. 2019. Metagenomics analysis of cocoa bean fermentation microbiome identifying species diversity and putative functional capabilities. *Heliyon*, 5(7), 02170.
- Álvarez-Sánchez, B., Priego-Capote, F., y Castro, M. D. L. 2010. Metabolomics analysis II. Preparation of biological samples prior to detection. *Trends in Analytical Chemistry*, 29(2), 120–127.
- Anastassiadis, S. 2006. Citric acid production from glucose by yeast *Candida oleophila* ATCC 20177 under batch, continuous and repeated batch cultivation. *Electronic Journal of Biotechnology* 9(1).
- Andújar, I., Recio, M. C., Giner, R. M., y Ríos, J. L. 2012. Cocoa polyphenols and their potential benefits for human health. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* 2012.
- Apriyanto, M., & Harmayani, E. 2017. Amino acid analysis of cocoa fermented by High Performance Liquid Chromatography (HPLC). *Asian J. Dairy & Food Res*, 36(2), 156–160.
- Aprotosoai, A. C., Luca, S. V., y Miron, A. 2016. Flavor Chemistry of Cocoa and Cocoa Products- An Overview. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 15(1),
- Arana-Sánchez, A., Segura-García, L. E., Kirchmayr, M., Orozco-Ávila, I., Lugo-Cervantes, E., y Gschaedler-Mathis, A. 2015. Identification of predominant yeasts associated with artisan Mexican cocoa fermentations using culture-dependent and culture-independent approaches. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 31(2), 359–369.
- Ardhana, M. M., y Fleet, G. H. 2003. The microbial ecology of cocoa bean fermentations in Indonesia. *International Journal of food microbiology* 86, 87–99.

- Ascrizzi, R., Flamini, G., Tessieri, C., y Pistelli, L. 2017. From the raw seed to chocolate: Volatile profile of Blanco de Criollo in different phases of the processing chain. *Microchemical Journal*, 133, 474–479.
- Assi-Clair, B. J., Koné, M. K., Kouamé, K., Lahon, M. C., Berthiot, L., Durand, N., Lebrun, M., Julien-Ortiz, A., Maraval, I., Boulanger, R., y Guéhi, T. S. 2019. Effect of aroma potential of *Saccharomyces cerevisiae* fermentation on the volatile profile of raw cocoa and sensory attributes of chocolate produced thereof. *European Food Research and Technology*, 245(7), 1459–1471.
- Batista, Nádia Nara, Ramos, C. L., Dias, D. R., Pinheiro, A. C. M., y Schwan, R. F. 2016. The impact of yeast starter cultures on the microbial communities and volatile compounds in cocoa fermentation and the resulting sensory attributes of chocolate. *Journal of Food Science and Technology*, 53(2), 1101–1110.
- Batista, Nadia Nara, Ramos, C. L., Ribeiro, D. D., Pinheiro, A. C. M., y 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.
- Beg, M. S., Ahmad, S., Jan, K., & Bashir, K. 2017. Status, supply chain and processing of cocoa - A review. *Trends in Food Science and Technology*, 66, 108–116.
- Bonvehí, J. S. 2005. Investigation of aromatic compounds in roasted cocoa powder. *European Food Research and Technology*, 221(1–2), 19–29.
- Caligiani, A., Marseglia, A., Prandi, B., Palla, G., y Sforza, S. 2016. Influence of fermentation level and geographical origin on cocoa bean oligopeptide pattern. *Food Chemistry*, 211, 431–439.
- Camu, N., González, Á., De Winter, T., Van Schoor, A., De Bruyne, K., Vandamme, P., Takrama, J. S., Addo, S. K., y De Vuyst, L. 2008a. 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.
- Camu, N., Winter, T. De, Addo, S. K., Takrama, J. S., Bernaert, H., y Vuyst, L. De. 2008b. 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(13), 2288–2297.
- Capote, F. P., Jiménez, J. R., y De Castro, M. D. L. 2007. Sequential (step-by-step) detection, identification and quantitation of extra virgin olive oil adulteration by chemometric treatment of chromatographic profiles. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 388(8), 1859–1865.
- Carpenter, J. F., Prestrelski, S. J., y Arakawa, T. 1993. Separation of Freezing- and Drying-Induced Denaturation of Lyophilized Proteins Using Stress-Specific Stabilization; *Archives of Biochemistry and Biophysics* (pp. 456–464).
- Castro-Alayo, E. M., Idrogo-Vásquez, G., Siche, R., y Cardenas-Toro, F. P. 2019. Formation of aromatic compounds precursors during fermentation of Criollo and Forastero cocoa. *Heliyon*, 5(1).

- Castro-Puyana, M., y Herrero, M. 2013. Metabolomics approaches based on mass spectrometry for food safety, quality and traceability. *TrAC - Trends in Analytical Chemistry*, 52, 74–87.
- CEDRSSA. 2020. Centro de Estudios para el Desarrollo Rural Sustentable y la Soberanía Alimentaria. Industria del cacao en México.
http://www.cedrssa.gob.mx/post_industria_del_-n-cacao_en_mn-xico-n.htm
- Celso, G., Chagas, A., Rosa, N., Beatriz, M., Gloria, A., Helena, L., y Santos, A. 2021. Chemical implications and time reduction of on-farm cocoa fermentation by *Saccharomyces cerevisiae* and *Pichia kudriavzevii*. *Food Chemistry*, 338(4), 127834.
- Cevallos-Cevallos, J. M., Reyes-De-Corcuera, J. I., Etxeberria, E., Danyluk, M. D., y Rodrick, G. E. 2009. Metabolomic analysis in food science: a review. *Trends in Food Science & Technology*, 20(11–12), 557–566.
- Cevallos-Cevallos, J. M., Gysel, L., Maridueña-Zavala, M. G., y Molina-Miranda, M. J. 2018. Time-Related Changes in Volatile Compounds during Fermentation of Bulk and Fine-Flavor Cocoa (*Theobroma cacao*) Beans. *Journal of Food Quality*, 2018.
- Christopher, H., Powis, T. G., Cyphers, A., Gaikwad, N. W., Grivetti, L., y Cheong, K. 2011. Cacao use and the San Lorenzo Olmec. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 3(3), 8595–8600.
- Corcoran, B. M., Ross, R. P., Fitzgerald, G. F. y Stanton, C. 2004. Comparative survival of probiotic *lactobacilli* spray-dried in the presence of prebiotic substances. *Journal of Applied Microbiology*. 96(5):1024–1039.
- Counet, C., Ouwerx, C., Rosoux, D., y Collin, S. 2004. Relationship between procyanidin and flavor contents of cocoa liquors from different origins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(20), 6243–6249.
- Crafack, M., Keul, H., Eskildsen, C. E., Petersen, M. A., Saerens, S., Blennow, A., Skovmand-Larsen, M., Swiegers, J. H., Petersen, G. B., Heimdal, H., y Nielsen, D. S. 2014. Impact of starter cultures and fermentation techniques on the volatile aroma and sensory profile of chocolate. *Food Research International*, 63, 306–316.
- Crafack, M., Mikkelsen, M. B., Saerens, S., Knudsen, M., Blennow, A., Lowor, S., Takrama, J., Swiegers, J. H., Petersen, G. B., Heimdal, H., y 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.
- Cubero-Leon, E., Peñalver, R., y Maquet, A. 2014. Review on metabolomics for food authentication. *Food Research International*, 60, 95–107.
- De Roos, J., y De Vuyst, L. 2018. Acetic acid bacteria in fermented foods and beverages. *Current Opinion in Biotechnology*, 49, 115–119.
- Dettmer, K., Aronov, P. A., y Hammock, B. D. 2007. Mass spectrometry-based metabolomics. *Mass Spectrometry Reviews*, 26(1), 51–78.
- Deus, V. L., Bispo, E. S., Franca, A. S., y Gloria, M. B. A. 2020. Influence of cocoa clones on the quality and functional properties of chocolate. *Nitrogenous compounds*, 134(April), 110202.

- Díaz-Muñoz, C., Van de Voorde, D., Comasio, A., Verce, M., Hernandez, C. E., Weckx, S., y De Vuyst, L. 2021. Curing of Cocoa Beans: Fine-Scale Monitoring of the Starter Cultures Applied and Metabolomics of the Fermentation and Drying Steps. *Frontiers in Microbiology*, 11, 616875.
- Dimick, P. S. 1990. Acidic Characteristics of Fermented and Dried Cocoa Beans from Different Countries of Origin. *Food science*-547. 55(2), 547–550.
- Doyle, P. M., Beuchat, R. L. y Montville, J. T. 2001. Food Microbiology. Fundamentals and Frontiers. 2nd Edition. Ed. ASM Press. N.W., Washington, DC. Pp. 721-730.
- Dubon A, Sanchez J, 2016. *Manual de Producción de Cacao*, 2a ed. La Lima, Cortes: FHIA, 264 P.
- Fiehn, O. 2002. Metabolomics - The link between genotypes and phenotypes. *Plant Molecular Biology*, 48(1–2), 155–171
- Fiehn, O. (2016). Metabolomics by gas chromatography-mass spectrometry: Combined targeted and untargeted profiling. In *Current Protocols in Molecular Biology*, 114, 30.34.31–30.34.32.
- Fiehn, O., Sumner, L. W., Rhee, S. Y., Ward, J., Dickerson, J., Lange, B. M., Lane, G., Roessner, U., Last, R., y Nikolau, B. 2007. Minimum reporting standards for plant biology context information in metabolomic studies. *Metabolomics*, 3(3), 195–201.
- Figueroa-Hernández, C., Mota-Gutierrez, J., Ferrocino, I., Hernández-Estrada, Z. J., González-Ríos, O., Cocolin, L., y Suárez-Quiroz, M. L. 2019. The challenges and perspectives of the selection of starter cultures for fermented cocoa beans. *International Journal of Food Microbiology*, 301(April), 41–50.
- Frigolet, M. E., y Gutiérrez-Aguilar, R. 2017. Ciencias “ómicas”, ¿cómo ayudan a las ciencias de la salud? *Revista Digital Universitaria*, 18(7), 0–15.
- Ganeswari, I., Khairul Bariah, S., Amizi, M. A., & Sim, K. Y. 2015. Effects of different fermentation approaches on the microbiological and physicochemical changes during cocoa bean fermentation. *International Food Research Journal*, 22(1), 70–76.
- García-Alamilla, P., 2005 "Modelamiento y análisis de transporte de humedad, acidez volátil, energía térmica en el proceso de secado de cacao" Tesis de Doctorado en Ciencias en Alimentos. Unidad de Investigación y Desarrollo en Alimentos- ITVER.
- García-Alamilla, P., Salgado-Cervantes, M. A., Barel, M., Berthomieu, G., Rodríguez-Jimenes, G. C., y García-Alvarado, M. A. 2007. Moisture, acidity and temperature evolution during cacao drying. *Journal of Food Engineering*, 79(4), 1159–1165.
- Geralda, S. E., Borges, M. F., Medina, C., Hilsdorf, P. R. y Schwan F. R. 2005. Pectinolytic enzymes secreted by yeasts from tropical fruits. *Fems Yeast Res.* 5:859–865.
- Giacometti, J., Jolic, S.M., Josic, D., 2015. Cocoa processing and impact on composition. In: Preedy, V. (Ed.), *Processing and Impact on Active Components in Food*. Elsevier, pp. 605–612.
- Gil, M., Llano, S., Jaramillo, Y., Quijano, J., y Londono-Londono, J. 2020. Matrix effect on quantification of sugars and mannitol developed during the postharvest of cocoa: an alternative method for traceability of aroma precursors by liquid chromatography with an evaporative detector. *Journal of Food Science and Technology*, 57(1), 210–221.

- Gorrochategui, E., Jaumot, J., Lacorte, S., y Tauler, R. 2016. Data analysis strategies for targeted and untargeted LC-MS metabolomic studies: Overview and workflow. *TrAC - Trends in Analytical Chemistry*, 82, 425–442.
- Haile, M. 2019. Antioxidant Activity, Total Polyphenol, Flavonoid and Tannin Contents of Fermented Green Coffee Beans with Selected Yeasts. *Fermentation* 24(02)22.
- Hamdouche, Y., Guehi, T., Durand, N., Kedjebo, K. B. D., Montet, D., y Meile, J. C. 2015. Dynamics of microbial ecology during cocoa fermentation and drying: Towards the identification of molecular markers. *Food Testigo*, 48, 117–122.
- Hansen, C. E., Del Olmo, M., y Burri, C. 1998. Enzyme activities in cocoa beans during fermentation. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 77(2), 273–281.
- Hashim, P., Selamat, J., Muhammad, S. K. S., y Ali, A. 1998. Changes in free amino acid, peptide-N, sugar and pyrazine concentration during cocoa fermentation. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 78(4), 535–542.
- Hernández-Hernández, C., Viera-Alcaide, I., Morales-Sillero, A. M., Fernández-Bolaños, J., & Rodríguez-Gutiérrez, G. 2018. Bioactive compounds in Mexican genotypes of cocoa cotyledon and husk. *Food Chemistry*, 240, 831–839.
- Ho, V. T. T., Zhao, J., y Fleet, G. 2014. Yeasts are essential for cocoa bean fermentation. *International Journal of Food Microbiology*, 174, 72–87.
- Ho, V. T. T., Zhao, J., y Fleet, G. 2015. The effect of lactic acid bacteria on cocoa bean fermentation. *International Journal of Food Microbiology*, 205, 54–67.
- Hotelling, H. 1933. Analysis of a complex of statistical variables into principal components. *Journal of Educational Psychology*, 24(6), 417–441.
- ICCO 2020/21. Quarterly Bulletin of cocoa Statistics of cocoa, Vol. XLVII, N°, cocoa year 2020/21.
- ICCO 2013 (Organización Internacional del Cacao). Agenda cacaotera global
- Jinap, S., Wan Rosli, W. I., Russly, A. R., y Nordin, L. M. 1998. Effect of roasting time and temperature on volatile component profiles during nib roasting of cocoa beans (*Theobroma cacao*). *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 77(4), 441–448.
- Jakobsen R. & Nielsen (2022). Zoto 16s and ITS sequencing analysis. University of Copenhagen.
- Katajamaa, M., y Orešič, M. 2007. Data processing for mass spectrometry-based metabolomics. *Journal of Chromatography*, 1158(1–2), 318–328.
- Koné, M. K., Guéhi, S. T., Durand, N., Ban-Koffi, L., Berthiot, L., Tachon, A. F., Brou, K., Boulanger, R., y Montet, D. 2016. Contribution of predominant yeasts to the occurrence of aroma compounds during cocoa bean fermentation. *Food Research International*, 89, 910–917.
- Kongor, J. E., Hinneh, M., de Walle, D. Van, Afoakwa, E. O., Boeckx, P., y Dewettinck, K. 2016. Factors influencing quality variation in cocoa (*Theobroma cacao*) bean flavour profile. A review. *Food Research International*, 82, 44–52.
- Kosmides, A. K., Kamisoglu, K., Calvano, S. E., Corbett, S. A., y Androulakis, I. P. 2013. Metabolomic fingerprinting: Challenges and opportunities. *Critical Reviews in Biomedical Engineering*, 41(3),

- Lagunes Gálvez, S., Loiseau, G., Paredes, J. L., Barel, M., y 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.
- Leal, G. A., Gomes, L. H., Efraim, P., De Almeida Tavares, F. C., y 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.
- Ledesma-Escobar, C. A., Priego-Capote, F., Robles-Olvera, V. J., y Luque de Castro, M. D. 2017. Changes in the composition of the polar fraction of Persian lime (*Citrus latifolia*) during fruit growth by LC–QTOF MS/MS analysis. *Food Chemistry*, 234, 262–268.
- Ledesma-Escobar, Carlos A., Priego-Capote, F., Robles-Olvera, V. J., García-Torres, R., Reyes De Corcuera, J. I., y Luque de Castro, M. D. 2019. GC-MS study of changes in polar/mid-polar and volatile compounds in Persian lime (*Citrus latifolia*) during fruit growth. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 99(3), 1020–1028.
- Ledesma-Escobar, Carlos A., 2016. "Metabolómica como herramienta para el estudio de cítricos". Tesis de Doctorado en Ciencias en Alimentos. Unidad de Investigación y Desarrollo en Alimentos- ITVER.
- Lefeber, T., Gobert, W., Vrancken, G., Camu, N., y 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.
- Lefeber, T., Papalexandratou, Z., Gobert, W., Camu, N., y De Vuyst, L. 2012. On-farm implementation of a starter culture for improved cocoa bean fermentation and its influence on the flavour of chocolates produced thereof. *Food Microbiology*, 30(2), 379–392.
- Lima, L. J. R., Almeida, M. H., Rob Nout, M. J., y 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.
- Liu, Y. K., Kuo, H. C., Lai, C. H., y Chou, C. C. 2020. Single amino acid utilization for bacterial categorization. *Scientific Reports*, 0123456789, 1–12.
- López, S., Prieto, M., Dijkstra, J., Dhanoa, M. S., y France, J. 2004. Statistical evaluation of mathematical models for microbial growth. *International Journal of Food Microbiology*, 96(3), 289–300.
- Loviso, C. L., y Libkind, D. 2019. Síntesis y regulación de los compuestos del aroma y sabor derivados de la levadura en la cerveza: alcoholes superiores. *Revista Argentina de Microbiología*, 51(4), 386–397.
- Magalhães da Veiga Moreira, I., de Figueiredo Vilela, L., da Cruz Pedroso Miguel, M. G., Santos, C., Lima, N., y Freitas Schwan, R. 2017. Impact of a Microbial Cocktail Used as a Starter Culture on Cocoa Fermentation and Chocolate Flavor. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 22(5).
- Mattia, C. D. Di, Sacchetti, G., Mastrocola, D., y Serafini, M. 2017. From Cocoa to Chocolate: The impact of Processing on In Vitro Antioxidant Activity and the effects of Chocolate on Antioxidant Markers In Vivo. *Frontiers in immunology*, 8(September), 1–7.

- Mayorga-Gross, A. L., Quirós-Guerrero, L. M., Fourny, G., y Vaillant, F. 2016. An untargeted metabolomic assessment of cocoa beans during fermentation. *Food Research International*, 89, 901–909.
- Meersman, E., Steensels, J., Paulus, T., Struyf, N., Saels, V., Mathawan, M., Koffi, J., Vrancken, G., y Verstrepen, K. J. 2015. Breeding strategy to generate robust yeast starter cultures for cocoa pulp fermentations. *Applied and Environmental Microbiology*, 81(18), 6166–6176.
- Meersman, E., Steensels, J., Struyf, N., Paulus, T., Saels, V., Mathawan, M., Allegaert, L., Vrancken, G., y Verstrepen, K. J. 2016. Tuning chocolate flavor through development of thermotolerant *Saccharomyces cerevisiae* starter cultures with increased acetate ester production. *Applied and Environmental Microbiology*, 82(2), 732–746.
- Megias-Perez, R., Moreno-Zambrano, M., Behrends, B., Corno, M., y Kuhnert, N. 2020. Monitoring the changes in low molecular weight carbohydrates in cocoa beans during spontaneous fermentation: A chemometric and kinetic approach. *Food Research International*, 128(July 2019), 108865.
- Menezes, A. G. T., Batista, N. N., Ramos, C. L., de Andrade e Silva, A. R., Efraim, P., Pinheiro, A. C. M., y Schwan, R. F. 2016. Investigation of chocolate produced from four different Brazilian varieties of cocoa (*Theobroma cacao* L.) inoculated with *Saccharomyces cerevisiae*. *Food Research International*, 81, 83–90.
- Misnawi, A., Jinap, S., Jamilah, B., y Nazamid, S. 2004. Sensory properties of cocoa liquor as affected by polyphenol concentration and duration of roasting. *Food Quality and Preference*, 15(5), 403–409.
- Mohamadi Alasti, F., Asefi, N., Maleki, R., y SeiedlouHeris, S. S. 2019. Investigating the flavor compounds in the cocoa powder production process. *Food Science and Nutrition*, 7(12), 3892–3901.
- Moreira, I. M. da V., Vilela, L. de F., Santos, C., Lima, N., y Schwan, R. F. 2018. Volatile compounds and protein profiles analyses of fermented cocoa beans and chocolates from different hybrids cultivated in Brazil. *Food Research International*, 109(April), 196–203.
- Motamayor, J. C., Risterucci, A. M., Lopez, P. A., Ortiz, C. F., Moreno, A., y Lanaud, C. 2002. Cacao domestication I: The origin of the cacao cultivated by the Mayas. *Heredity*, 89(5), 380–386.
- Motamayor, J. C., Lachenaud, P., Wallace, J., Llor, R., Kuhn, D. N., Brown, S., y Schnell, R. J. 2008. Geographic and Genetic Population Differentiation of the Amazonian Chocolate Tree (*Theobroma cacao* L.). *Plos one* 3(10)
- Mottram, D. S. (1993). Flavor Compounds Formed during the Maillard. *Reaction. American Chemical Society* 104–126.
- Mozzi, F., Ortiz, M. E., Bleckwedel, J., De Vuyst, L., y Pescuma, M. 2013. Metabolomics as a tool for the comprehensive understanding of fermented and functional foods with lactic acid bacteria. *Food Research International*, 54(1), 1152–1161.
- Muccio, Z., y Jackson, G. P. 2009. Isotope ratio mass spectrometry. *Analyst*, 134(2), 213–222.

- Myint, K. T., Aoshima, K., Tanaka, S., Nakamura, T., y Oda, Y. 2009. Quantitative profiling of polar cationic metabolites in human cerebrospinal fluid by reversed-phase nanoliquid chromatography/mass spectrometry. *Analytical Chemistry*, 81(3), 1121–1129.
- Naik, B., y Kumar, V. 2014. Cocoa Butter and Its Alternatives: A Reveiw. *Journal of Bioresource Engineering and Technology*, 1(March 2014), 7–17.
- Nazaruddin, R., Seng, L. K., Hassan, O., y 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.
- Nielsen, D. S., Hønholt, S., Tano-Debrah, K., y Jespersen, L. 2005. Yeast populations associated with Ghanaian cocoa fermentations analyzed using denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE). *Yeast*, 22(4), 271–284.
- Norma Mexicana NMX-F-272. Granos de cacao - Prueba de corte (Prueba de corte para granos de cacao).
- Ochi, H., Naito, H., Iwatsuki, K., Bamba, T., y Fukusaki, E. 2012. Metabolomics-based component profiling of hard and semi-hard natural cheeses with gas chromatography/time-of-flight-mass spectrometry, and its application to sensory predictive modeling. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 113(6), 751–758.
- Ogundero, W. V. 1983. Thermophilic fungi and fermenting cocoa beans in Nigeria. *Mycopathologia*. 82:159-165.
- Ooi, T. S., Ting, A. S. Y., y Siow, L. F. 2020. Influence of selected native yeast starter cultures on the antioxidant activities, fermentation index and total soluble solids of Malaysia cocoa beans: A simulation study. *Lwt*, 122.
- Ostovar, K., y Keeney, P. G. 1973. Isolation and Characterization in the Fermentation O F Trinidad'. *Journal of Food Science*, 38(7973), 611–6117.
- Ozturk, G., y Young, G. M. 2017. The Impact of Society and Science on the Fermentation of Cocoa Beans. *Food Evolution*, 16, 431–455.
- Páez, R. B. 2013. Desarrollo de cultivos probióticos deshidratados por secado Spray para aplicación en alimento. Estudios microbiológicos y tecnológicos. Tesis de doctorado en ciencia exactas. Universidad nacional de la plata. Buenos Aires, Argentina.
- Papalexandratou, Z., Vrancken, G., de Bruyne, K., Vandamme, P., y 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.
- Passos, F. M. L., Silva, D. O., Lopez, A., Ferreira, C., y Guimarães, W. V. 1984. Characterization and Distribution of Lactic Acid Bacteria from Traditional Cocoa Bean Fermentations in Bahia. *Journal of Food Science*, 49(1), 205–208.
- Pedan, V., Fischer, N., Bernath, K., Hühn, T., y Rohn, S. 2017. Determination of oligomeric proanthocyanidins and their antioxidant capacity from different chocolate manufacturing stages using the NP-HPLC-online-DPPH methodology. *Food Chemistry*, 214, 523–532.

- Peralbo-Molina, Á., Priego-Capote, F., y Luque De Castro, M. D. 2012. Tentative identification of phenolic compounds in olive pomace extracts using liquid chromatography-tandem mass spectrometry with a quadrupole- quadrupole-time-of-flight mass detector. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60(46), 11542–11550.
- Potts, P. J., y Potts, P. J. 1987. Mass spectrometry: principles and instrumentation. *A Handbook of Silicate Rock Analysis*, 497–522.
- Powis, T. G., Cyphers, A., Gaikwad, N. W., Grivetti, L., y Cheong, K. 2011. Cacao use and the San Lorenzo Olmec. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108(21), 8595–8600.
- Ramos, C. L., Dias, D. R., Miguel, M. G. da C. P., y Schwan, R. F. 2014. Impact of different cocoa hybrids (*Theobroma cacao* L.) and *S. cerevisiae* UFLA CA11 inoculation on microbial communities and volatile compounds of cocoa fermentation. *Food Research International*, 64, 908–918.
- Rochfort, S., Ezernieks, V., Bastian, S. E. P., y Downey, M. O. 2010. Sensory attributes of wine influenced by variety and berry shading discriminated by NMR metabolomics. *Food Chemistry*, 121(4), 1296–1304.
- Rodriguez-Campos, J., Escalona-Buendía, H. B., Contreras-Ramos, S. M., Orozco-Avila, I., Jaramillo-Flores, E., y Lugo-Cervantes, E. 2012. Effect of fermentation time and drying temperature on volatile compounds in cocoa. *Food Chemistry*, 132(1), 277–288.
- Rodriguez-Campos, J., Escalona-Buendía, H. B., Orozco-Avila, I., Lugo-Cervantes, E., & Jaramillo-Flores, M. E. (2011). Dynamics of volatile and non-volatile compounds in cocoa (*Theobroma cacao* L.) during fermentation and drying processes using principal components analysis. *Food Research International*, 44(1), 250–258.
- Romanens, E., Pedan, V., Meile, L., y Schwenninger, S. M. 2020. Influence of two anti-fungal *Lactobacillus* cultures on cocoa bean fermentation and final bean quality. *PLoS One*, 15 (10).
- Romero, Cortes T. 2011. "Estudio de la microespo microbiana y evaluación de metabolitos producidos durante la fermentación de cacao (*Theobroma cacao*)". Tesis de Doctorado en Ciencias en Alimentos. Unidad de Investigación y Desarrollo en Alimentos- ITVER.
- Rottiers, H., Tzompa Sosa, D. A., De Winne, A., Ruales, J., De Clippeleer, J., De Leersnyder, I., De Wever, J., Everaert, H., Messens, K., & Dewettinck, K. 2019. Dynamics of volatile compounds and flavor precursors during spontaneous fermentation of fine flavor Trinitario cocoa beans. *European Food Research and Technology*, 245(9), 1917–1937.
- SAGARPA, 2017/2030. Sistema de información agroalimentaria y de consulta. Servicio de información agroalimentaria y pesquera. Planeación Agrícola Nacional.
- Saltini, R., Akkerman, R., y Frosch, S. 2013. Optimizing chocolate production through traceability: A review of the influence of farming practices on cocoa bean quality. *Food Testigo*, 29(1), 167–187.
- Sandhya, M. V. S., Yallappa, B. S., Varadaraj, M. C., Puranaik, J., Rao, L. J., Janardhan, P., y Murthy, P. S. 2016. Inoculum of the starter consortia and interactive metabolic process in

- enhancing quality of cocoa bean (*Theobroma cacao*) fermentation. *LWT - Food Science and Technology*, 65, 731–738.
- Schwan, R. F., y Wheals, A. E. 2004. The microbiology of cocoa fermentation and its role in chocolate quality. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 44(4), 205–221.
- Schwan, R. F. 1998. Cocoa fermentations conducted with a defined microbial cocktail inoculum. *Applied and Environmental Microbiology*, 64(4), 1477–1483.
- Senanayake, M., Jansz, E. R., y Buckle, K. A. 1997. Effect of Different Mixing Intervals on the Fermentation of Cocoa Beans. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 74(1), 42–48.
- Serra, J. L., Moura, F. G., Pereira, G. V. d. M., Soccol, C. R., Rogez, H., y Darnet, S. 2019. Determination of the microbial community in Amazonian cocoa bean fermentation by Illumina-based metagenomic sequencing. *Lwt*, 106(February), 229–239.
- Spizzirri, U. G., Ieri, F., Campo, M., Paolino, D., Restuccia, D., y Romani, A. 2019. Compounds of Unroasted and Roasted Cocoa Beans with Different Origin. *Foods* 27(6)30
- Sweetlove, L. J., y Fernie, A. R. 2013. The spatial organization of metabolism within the plant cell. *Annual Review of Plant Biology*, 64(January), 723–746.
- Swiegers, J. H., Bartowsky, E. J., Henschke, P. A., y Pretorius, I. S. 2005. Yeast and bacterial modulation of wine aroma and flavour. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 11(2), 139–173.
- Tanaka, T., Takahashi, R., Kouno, I., & Nonaka, G. I. (1994). Chemical evidence for the de-astringency (insolubilization of tannins) of persimmon fruit. *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions*, 20, 3013
- Teixeira, P., Castro, H. y Kirby, R. 1995. Spray drying as a method for preparing concentrated cultures of *Lactobacillus bulgaricus*. *Journal of Applied Bacteriology*, 78: 456–462.
- Theodoridis, G., Gika, H. G., y Wilson, I. D. 2008. LC-MS-based methodology for global metabolite profiling in metabonomics/metabolomics. *TrAC - Trends in Analytical Chemistry*, 27(3), 251–260.
- Utrilla-Vázquez, M., Rodríguez-campos, J., Avendaño-arazate, C. H., Gschaedler, A., & Lugo-cervantes, E. 2020. Analysis of volatile compounds of fi ve varieties of Maya cocoa during fermentation and drying processes by Venn diagram and PCA. *Food Research International*, 129, 108834.
- Visintin, S., Ramos, L., Batista, N., Dolci, P., Schwan, F., y Cocolin, L. 2017. Impact of *Saccharomyces cerevisiae* and *Torulaspora delbrueckii* starter cultures on cocoa beans fermentation. *International Journal of Food Microbiology*, 257, 31–40.
- Vinícius de Melo Pereira, G., Soccol, V. T., Brar, S. K., Neto, E., & Soccol, C. R. 2017). Microbial ecology and starter culture technology in coffee processing. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 57(13), 2775–2788.
- Voigt, J., Biehl, B., y Heinrichs, H. 2003. *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. 49(1994), 173–180.

- Voigt, J., Voigt, G., Heinrichs, H., Wrann, D., y Biehl, B. 1994. In-vitro studies on the proteolytic formation of the characteristic aroma precursors of fermented cocoa seeds: The significance of endoprotease specificity. *Food chemistry* 51, 7–14.
- Vuyst, L. De, y Weckx, S. 2016. The cocoa bean fermentation process: from ecosystem analysis to starter culture development. *Journal of Applied Microbiology*, 121, 5–17.
- Wang, Z., y Jones, A. D. 2014. Profiling of stable isotope enrichment in specialized metabolites using liquid chromatography and multiplexed nonselective collision-induced dissociation. *Analytical Chemistry*, 86(21), 10600–10607.
- Wei, L., Wai, M., Curran, P., Yu, B., y Quan, S. 2015. Coffee fermentation and flavor – An intricate and delicate relationship. *Food chemistry*, 185, 182–191.
- Wishart, D. S. 2008. Metabolomics: applications to food science and nutrition research. *Trends in Food Science and Technology*, 19(9), 482–493.
- Wu, Y., y Li, L. 2016. Sample normalization methods in quantitative metabolomics. *Journal of Chromatography*, 1430, 80–95.
- Xiao, Z., & Lu, J. R. 2014. Strategies for enhancing fermentative production of acetoin: A review. *Biotechnology Advances*, 32(2), 492–503.
- Zzaman, W.; Bhat, R.; Yang, T.A. 2013 Effect of Superheated Steam and Convection Roasting on Changes in Physical properties of Cocoa Bean (*Theobroma cacao* L.). *Food Science and Technology Research*, 19, 181–186.

8 ANEXOS

8.1 Preparación de los medios de cultivo

TABLA 8.1. Composición del medio de cultivo Man-Rogosa-Sharpe (MRS)

Componente	Cantidad (g/L)
Glucosa	20
Peptona de caseína	10
Extracto de carne	8
Fosfato de potasio dibásico	4
Acetato de sodio	2
Citrato de amonio	5
Sulfato de magnesio	0.02
Sulfato de manganeso	0.04
Tween 80	1
Agar*	12

pH final: 6.8

*Omitir en preparación en caldo

En un matraz Erlenmeyer se mezclaron los componentes del medio de cultivo con agitación continua hasta disolver por completo, posteriormente se esterilizó a 121 °C por 15 min. La glucosa fue diluida en un 20% del volumen total de la mezcla y se esterilizó por separado para evitar la reacción de Maillard (oscurecimiento enzimático).

TABLA 8.2 Composición del medio CARR modificado.

Componente	g/L
Glucosa	3
Agar*	15
CaCO ₃	10
Azul de bromotimol	0.04
Etanol	17.5 mL
Extracto de levadura	10

*Omitir en preparación en caldo

En un matraz Erlenmeyer se mezclaron los componentes del medio de cultivo con agitación continua hasta disolver por completo, posteriormente se esterilizó a 121 °C por 15 min.

TABLA 8.3 Composición del medio YEPD o YPD

Componente	g/L
Glucosa	20
Extracto de levadura	10
Peptona de caseína	20
Agar*	15

*Omitir en preparación en caldo

En un matraz Erlenmeyer se mezclaron los componentes del medio de cultivo con agitación continua hasta disolver por completo, posteriormente se esterilizó a 121 °C por 15 min.

